



Rôle de la protéine Arc (Activity-regulated cytoskeleton-associated protein) dans les adaptations moléculaires et comportementales induites par la cocaïne

Marine Salery

► To cite this version:

Marine Salery. Rôle de la protéine Arc (Activity-regulated cytoskeleton-associated protein) dans les adaptations moléculaires et comportementales induites par la cocaïne. Neurosciences [q-bio.NC]. Université Pierre et Marie Curie - Paris VI, 2015. Français. NNT : 2015PA066400 . tel-01378909

HAL Id: tel-01378909

<https://theses.hal.science/tel-01378909>

Submitted on 11 Oct 2016

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

**THESE DE DOCTORAT DE
L'UNIVERSITE PIERRE ET MARIE CURIE**

Spécialité : Neurosciences
Ecole doctorale Cerveau Cognition et Comportement

Présentée par
Marine Salery

Pour obtenir le grade de
Docteur de l'Université Pierre et Marie Curie

**Rôle de la protéine Arc (Activity-regulated cytoskeleton-
associated protein) dans les adaptations moléculaires et
comportementales induites par la cocaïne**

Thèse soutenue le 9 octobre 2015 devant le jury composé de :

Dr. Jean-Antoine GIRAULT

Pr. Alban DE KERCHOVE D'EXAERDE

Dr. Emmanuel VALJENT

Dr. Laurence LANFUMEY

Pr. Serge LAROCHE

Dr. Jocelyne CABOCHE

Dr. Peter VANHOUTTE

Président du jury

Rapporteur

Rapporteur

Examinatrice

Examineur

Invitée

Directeur de thèse

SOMMAIRE

RESUME	- 5 -
ABSTRACT	- 6 -
ABREVIATIONS	- 7 -
INTRODUCTION	- 7 -
Chapitre I. Des apprentissages motivés à l'addiction	- 5 -
1. Apprentissage et récompense	- 5 -
a. Les apprentissages motivés par la récompense	- 6 -
b. Les circuits de la récompense	- 6 -
c. La dopamine	- 8 -
d. Dopamine et apprentissages motivés	- 10 -
2. L'addiction, une forme d'apprentissage pathologique	- 12 -
a. Définition de l'addiction	- 12 -
b. Modélisation de l'addiction chez le rongeur	- 13 -
c. Détournement des circuits de récompense par les drogues	- 15 -
3. Substrats neuronaux de l'addiction : focus sur le striatum	- 17 -
a. Le striatum	- 17 -
b. Les neurones du striatum	- 19 -
i. Les neurones épineux moyens (MSN)	- 19 -
ii. Les interneurones	- 20 -
c. Les drogues augmentent la concentration extracellulaire en DA	- 21 -
d. Le striatum, une structure de convergence	- 22 -
Chapitre II. Bases moléculaires de l'addiction	- 25 -
1. La voie ERK	- 26 -
2. La voie ERK, une cible commune des drogues d'abus	- 27 -
3. Activation de ERK par les drogues, convergence des signaux DA et glutamate au sein des MSN- 29 -	
a. Mécanismes d'activation de ERK en aval des D1R	- 29 -
b. ERK, détecteur de coïncidence	- 31 -
4. ERK et les adaptations comportementales induites par les drogues	- 32 -
a. ERK et sensibilisation locomotrice	- 32 -
b. ERK et préférence de place conditionnée (CPP)	- 33 -
c. ERK, rappel et reconsolidation de la mémoire associée à la drogue	- 34 -
d. ERK, symptômes de manque et rechute	- 34 -
5. ERK et la plasticité synaptique induite par les drogues	- 35 -

6.	Substrats cytoplasmiques de ERK	- 36 -
a.	Les protéines du cytosquelette	- 37 -
b.	Protéines membranaires	- 38 -
c.	Protéines cytoplasmiques	- 39 -
7.	Substrats nucléaires de ERK impliqués dans les adaptations neuronales induites par les drogues d'abus.....	- 40 -
a.	ERK et les régulations géniques induites par les drogues	- 40 -
b.	Régulations transcriptionnelles via la kinase MSK-1	- 43 -
c.	Régulations transcriptionnelles via Elk-1	- 45 -
d.	Régulations épigénétiques induites par les drogues	- 46 -
Chapitre III. Arc.....		- 49 -
1.	Arc, caractéristiques générales et spécificités	- 50 -
a.	Du gène à la protéine.....	- 50 -
b.	Un lien privilégié avec le cytosquelette.....	- 52 -
c.	<i>arc</i> , un IEG du système nerveux central	- 53 -
2.	Mécanismes cellulaires et moléculaires impliqués dans la régulation de l'expression de Arc ..	- 56 -
a.	Mécanismes de régulation de la transcription	- 56 -
i.	Signaux extracellulaires impliqués dans la transcription de <i>arc</i>	- 56 -
ii.	Voies de signalisation impliquées dans la transcription de <i>arc</i>	- 58 -
b.	Mécanismes de régulation des ARNm	- 62 -
i.	Contrôle spatial de l'expression des ARNm.....	- 62 -
ii.	Rôle de l'activité dans l'adressage dendritique	- 64 -
iii.	Contrôle temporel de l'expression des ARNm	- 66 -
c.	Mécanismes de régulation de l'expression de la protéine	- 68 -
i.	Régulation de la synthèse protéique	- 68 -
ii.	Régulation spatio-temporelle de l'expression protéique.....	- 70 -
3.	Arc, de l'exploration à l'apprentissage	- 72 -
a.	Arc, un marqueur de l'activité neuronale	- 72 -
b.	Arc et l'apprentissage.....	- 74 -
c.	Visualisation de l'expression de Arc.....	- 75 -
4.	Fonctions cellulaires de Arc et implications pour la plasticité	- 78 -
a.	Arc et l'endocytose des récepteurs AMPA	- 79 -
b.	Arc et la plasticité structurelle.....	- 82 -
c.	Emergence d'un rôle nucléaire de Arc	- 84 -
5.	Arc, plasticité synaptique et mémoire.....	- 86 -
a.	Rôle de Arc dans la plasticité à long terme	- 87 -
b.	Arc et la consolidation de la mémoire	- 88 -
6.	Arc et les drogues d'abus	- 89 -
a.	Régulation de l'expression de Arc par les drogues	- 89 -

b. Mécanismes cellulaires de régulation de l'expression de Arc par les drogues d'abus	- 90 -
c. Arc et les réponses comportementales induites par les drogues	- 93 -
OBJECTIFS	- 99 -
RESULTATS	- 99 -
Article	
1. Résumé de l'article	- 102 -
2. Article	- 157 -
Résultats supplémentaires	
1. Contexte	- 158 -
2. Résultats	- 160 -
a. Modèle in vivo d'injection unique de cocaïne.....	- 160 -
b. Activation in vitro du maillon pMnk-1/peIF4E.....	- 161 -
c. Modèle <i>ex vivo</i> (coll. Marc Dos Santos)	- 162 -
DISCUSSION ET PERSPECTIVES	- 186 -
1. Régulation de l'expression de Arc par la cocaïne	- 187 -
a. Localisation et cinétique d'induction de la protéine Arc dans le striatum.....	- 187 -
b. Voies de signalisation impliquées dans l'induction de Arc par la cocaïne dans le striatum.....	- 189 -
2. Localisation nucléaire de Arc	- 190 -
a. Mécanismes d'adressage de Arc vers le noyau	- 191 -
b. Stimuli impliqués dans la localisation nucléaire de Arc.....	- 192 -
3. Fonctions nucléaires de Arc	- 193 -
a. Arc et la phosphorylation des histones H3, vers une régulation de mécanismes épigénétiques ?	- 194 -
b. Arc, chromatine et ARN-Polymérase, vers une régulation de l'activité transcriptionnelle ?	- 196 -
c. Arc, une protéine associée au cytosquelette, vers un rôle structurel au sein du noyau ?	- 197 -
4. Arc répresseur transcriptionnel, vers une régulation homéostatique au sein du noyau	- 200 -
5. Arc et les adaptations comportementales induites par la cocaïne	- 202 -
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	- 206 -
ANNEXES	- 207 -

TABLES DES FIGURES

<u>Figure 1</u> : Illustration schématique des structures et connexions impliquées dans les circuits de récompense.....	- 8 -
<u>Figure 2</u> : Illustration des voies dopaminergiques mésencéphaliques.....	- 9 -
<u>Figure 3</u> : Représentation schématique des voies directes et indirectes du striatum au sein des ganglions de la base ..	- 18 -
<u>Figure 4</u> : Neurone épineux moyen du striatum	- 20 -
<u>Figure 5</u> : illustration schématique des interactions entre les systèmes dopaminergiques et glutamatergiques dans le striatum	- 24 -
<u>Figure 6</u> : Représentation simplifiée des étapes principales de la cascade de signalisation ERK	- 27 -
<u>Figure 7</u> : Activation sélective de ERK dans l'amygdale étendue en réponse aux substances stimulantes addictives ou non addictives.	- 28 -
<u>Figure 8</u> : Schéma de l'activation de ERK en aval de la voie D1/AMPC/PKA/DARPP-32.....	- 30 -
<u>Figure 9</u> : L'activation de ERK par la cocaïne dans le striatum est un intégrateur des signaux dopaminergiques et glutamatergiques	- 32 -
<u>Figure 10</u> : Accumulation nucléaire de la forme phosphorylée de ERK en réponse à une injection aigue de cocaïne ..	- 37 -
<u>Figure 11</u> : Changement de la morphologie des épines dendritiques en réponse à des injections répétées de cocaïne..	- 38 -
<u>Figure 12</u> : Représentation schématique de l'activation transcriptionnelle dépendante de CREB.....	- 44 -
<u>Figure 13</u> : Représentation schématique de la formation du complexe TCF	- 46 -
<u>Figure 14</u> : Représentation schématique de la séquence protéique de Arc.....	- 52 -
<u>Figure 15</u> : Induction de Arc en réponse à des chocs électro-convulsifs.....	- 55 -
<u>Figure 16</u> : Voies de signalisations impliquées dans l'activation transcriptionnelle de Arc	- 62 -
<u>Figure 17</u> : Régulation du transport de l'ARNm de Arc	- 66 -
<u>Figure 18</u> : Dégradation de l'ARNm de Arc par la voie du NMD	- 68 -
<u>Figure 19</u> : Schéma illustratif du modèle proposé pour la régulation du trafic des AMPAR par la protéine Arc ..	- 80 -
<u>Figure 20</u> : Cinétique d'activation de Mnk-1 en réponse à la cocaïne	- 160 -
<u>Figure 21</u> : Rôle de ERK dans l'activation de la protéine Mnk-1	- 161 -
<u>Figure 22</u> : Activation du maillon pMnk-1/pelF4E dans un modèle <i>in vitro</i> de culture de neurones striataux.....	- 162 -
<u>Figure 23</u> : Activation de pMnk-1 dans un modèle ex vivo de tranches de striatum	- 163 -
<u>Figure 24</u> : Effet de l'inhibition de pMnk-1 sur l'augmentation de la densité d'épines dendritiques induite par une stimulation G+S	- 163 -
<u>Figure 25</u> : Schéma bilan récapitulant les travaux obtenus au cours du travail de thèse.....	- 204 -
 <u>Table 1</u> : Signaux extracellulaires impliqués dans la régulation transcritptionnelle de Arc.....	- 58 -
<u>Table 2</u> : Paradigmes comportementaux conduisant à une augmentation d'expression de Arc	- 78 -
<u>Table 3</u> : Protocoles d'administration de drogues d'abus conduisant à une augmentation de l'expression de Arc ..	- 92 -

RESUME

Les adaptations cellulaires et moléculaires induites par les drogues au sein des neurones du système de récompense jouent un rôle central dans les altérations comportementales à long terme observées dans l'addiction. Cette étude s'inscrit dans une démarche de compréhension des processus cellulaires rapidement mis en jeu par la cocaïne et susceptibles d'impacter durablement le fonctionnement neuronal et les comportements.

La protéine Arc est un acteur majeur de la plasticité neuronale, elle est induite dans de nombreux paradigmes d'apprentissages et son expression est essentielle pour l'établissement de la plasticité synaptique à long terme et la consolidation de la mémoire. L'objectif de cette étude était de caractériser le profil et les modalités d'induction de Arc dans le striatum en réponse à la cocaïne et d'analyser son rôle dans les réponses moléculaires et comportementales induites par cette drogue.

Notre étude a montré que l'expression de Arc est augmentée rapidement et transitoirement dans le striatum après une injection unique de cocaïne sous la dépendance de l'activation de la voie ERK. Nos résultats montrent que la cocaïne induit une accumulation rapide et massive de la protéine Arc dans le noyau des neurones striataux. Dans le noyau Arc se localise dans des régions actives de transcription, à proximité des histones H3 sous leur forme phosphorylée. *In vitro*, la surexpression de Arc diminue la phosphorylation des histones H3 induite par le glutamate indiquant qu'elle altère le remodelage de la chromatine induit par l'activité neuronale. L'invalidation génétique et totale de la protéine *in vivo* dans un modèle de souris transgénique conduit à une décompaction de la chromatine associée à une augmentation de l'activité de la RNA Polymerase II démontrant que Arc exerce un effet répresseur sur les mécanismes transcriptionnels. La perte totale d'expression de Arc conduit à une augmentation de la sensibilité à la cocaïne et favorise le développement d'altérations comportementales à long terme induites par de faibles doses de cocaïne.

ABSTRACT

Molecular and cellular adaptations induced by drugs of abuse in the reward system play a key role in long-term behavioral alterations encountered in addiction. This work falls within an approach of understanding the cellular processes rapidly engaged by cocaine that could underlie the persistent alteration of neuronal physiology and behaviors.

Arc protein is a major player in neuronal plasticity. Arc is induced in many behavioral paradigms and is essential for long-term synaptic plasticity and memory consolidation. The aim of this study was to characterize the profile and modality of Arc induction within the mouse striatum in response to cocaine administration.

Our study shows that Arc expression is rapidly and transiently increased in the striatum after acute cocaine in an ERK-dependent fashion. This work revealed that cocaine-induced Arc protein rapidly and transiently accumulates in the nucleus of striatal neurons. In the nucleus, Arc is preferentially expressed in active transcription regions and localizes at the vicinity of phosphorylated histones H3. *In vitro* Arc overexpression decreased glutamate-induced Histones H3 phosphorylation showing that Arc interferes with activity-dependent chromatin remodeling. *In vivo* genetic invalidation of Arc expression in a transgenic mouse model was associated with a decreased chromatin compaction and increased RNA Polymerase II activity suggesting a repressive role of Arc on transcriptional mechanisms. Total Arc loss of expression leads to increased sensitivity to cocaine and promotes long-term behavioral alterations induced by low doses of cocaine.

ABBREVIATIONS

4EBP	eIF4E-binding protein
6-OHDA	6-Hydroxydopamine
A2RE	A2 response element
AMPA	Acide 2-amino-3-(5-méthyl-3-hydroxy-1,2-oxazol-4-yl)propanoïque
AMPc	Adénosine monophosphate cyclique
Arc	Activity-regulated and cytoskeleton-associated protein
ATV	Aire tegmentale ventrale
BDNF	Brain-derived neurotrophic factor
BLA	Noyau basolatéral de l'amygdale
BNST	Noyau du lit de la strie terminale
CaMK	Calcium calmodulin-dependent kinase
catFISH	Cellular compartment analysis of temporal activity by fluorescent in situ hybridization
CBP	CREB-binding protein
CPP	Préférences de place conditionnée
CRE	cAMP response element
CREB	cAMP-response element-binding protein
D1R	Récepteurs dopaminergiques de type D1
D2R	Récepteurs dopaminergiques de type D2
DA	Dopamine
DARPP-32	Dopamine- and cAMP-regulated phosphoprotein , Mr 32 kDa
DAT	Dopamine active transporter
DHPG	Dihydroxylphenylglycin
DS	Dorsal striatum
DTE	Dendritic targeting element
eEF2	Eukaryotic translation elongation factor-2
eIF4E	Eukaryotic translation initiation factor 4E
EJC	Exon-junction complex
ERK	Extracellular signal-regulated kinase
FMRP	Fragile-X mental retardation protein
GABA	Acide gaba-amino-butyrique
GAD	Acide glutamique décarboxylase
GFP	Green fluorescent protein
Gpe	Globus pallidus externe
GPi	Globus pallidus interne
HAT	Histones acetyl transferase
hnRNP	Heterogenous nuclear ribonucleoprotein
IEG	Immediate early gene
IRES	Internal ribosomal entries sequence
JNK	c-Jun n-terminal kinase
LTD	Long term depression
LTP	Long term potentiation
M4	Récepteur muscarinique de type 4
MAP	Microtubule associated protein
MAPK	Mitogen activated protein kinase
MEF2	Myocyte enhancer factor 2

MEK	MAPK/ERK-kinase
MEKK	MAPK/ERK-kinase-kinase
mEPSC	Miniature excitatory postsynaptic currents
mGluR	Récepteur métabotrope du glutamate
Mnk-1	Mitogen-activated protéine kinase-interacting kinase1
MSK1	Mitogen- and stress-activated protein kinase 1
MSN	Medium-sized spiny neuron
mTORC1	Mammalian target of rapamycin complex 1
NAcc	Noyau accumbens
NES	Nuclear export signal
NGF	Nerve growth factor
NLS	Nuclear localization signal
NMD	Nonsense mediated decay
NMDA	Acide N-méthyl-D-aspartic
NRD	Nuclear retention domain
NST	Noyau sous-thalamique
PDE	Phosphodiesterase
PFC	Cortex préfrontal
PH	Plekstrin-homology
PKA	Protéine kinase A
PKC	Protéine kinase C
PML-NB	promyelocytic leukemia nuclear bodies
PP-1	Protéine phosphatase 1
PRD	Proline rich domain
RNA-pol II	RNA polymerase II
RNP	Ribo-nucleoprotein particle
RR	Aire rétrocholinergique
SARE	Synaptic activity response element
SFK	Src family kinase
SH3	Src homology 3
SNC	Substance noire compacte
SNC	Système nerveux central
SNr	Substance noire réticulée
SRE	Serum responsive element
SRF	Serum responsive factor
STEP	Striatal-enriched protein phosphatase
TCF	Ternary complex factor
TrkB	Tropomyosin receptor kinase B
TSC2	Tuberous sclerosis complex 2
Ube3A	E3 ubiquitin-protein ligase 3A
WR2	WAVE 2 regulatory complex

INTRODUCTION

Chapitre I. Des apprentissages motivés à l'addiction

Au cours de la vie, le système nerveux central (SNC) reçoit des informations sensorielles en provenance du monde extérieur ainsi que des stimuli internes qui le renseignent sur les paramètres physiologiques de l'individu. L'intégration de ces signaux au sein du SNC permet à l'individu de répondre de manière appropriée aux changements environnementaux. L'activité nerveuse qui résulte de ces interactions fournit un mécanisme par lequel l'environnement peut influencer la structure et les fonctions du cerveau. Cette capacité des réseaux neuronaux à se modifier au cours de la vie est le reflet des propriétés plastiques du SNC. La plasticité neuronale se définit ainsi comme la capacité du cerveau à s'adapter à son environnement et à changer ses réponses en fonction des expériences déjà vécues. Cette plasticité sous-tend les processus d'apprentissage et de mémoire qui requièrent respectivement l'acquisition de nouvelles informations et l'encodage, le stockage ainsi que la récupération de celles-ci.

Au sein des structures cérébrales associées aux systèmes de stress et de récompense, les mécanismes de plasticité permettent à l'individu d'orienter son comportement de façon favorable à sa survie en fonction de situations déjà expérimentées. La plasticité de ces réseaux est importante pour les processus d'apprentissage motivés par la récompense qui permettent notamment de maintenir et reproduire des comportements importants pour la survie de l'individu. Ces systèmes qui sont, par définition, modulés de façon permanente par les stimuli extérieurs, sont également impactés par l'exposition aux drogues. Les substances addictives sont des composés chimiques capables de détourner la fonction physiologique de ces réseaux en modifiant leur fonctionnement aux niveaux cellulaire et moléculaire. Dans ces circuits, les drogues induisent une forme pathologique de plasticité neuronale qui semble jouer un rôle majeur dans les altérations comportementales observées dans l'addiction.

1. Apprentissage et récompense

La capacité des organismes à se procurer des ressources pour satisfaire leurs besoins physiologiques et rencontrer des partenaires pour se reproduire est primordiale pour la survie

de l'individu et la préservation de l'espèce. L'atteinte de ces objectifs procure une sensation de plaisir qui en fait des récompenses naturelles désirées et recherchées par les individus. L'efficacité à obtenir ces récompenses requiert des processus d'apprentissage qui permettront de détecter et mémoriser des indices et un contexte favorables à leur rencontre. Les mêmes mécanismes sont engagés pour les sensations négatives qui dicteront l'évitement de contextes dangereux ou douloureux pour l'individu. Les apprentissages motivés par la récompense permettent ainsi de maintenir ou reproduire des comportements favorables à la survie et ce, en fonction de situations déjà vécues.

a. Les apprentissages motivés par la récompense

Les processus d'apprentissages motivés permettent de détecter et de mémoriser l'association entre des indices et contextes spécifiques et des réponses particulières telles que le désir d'obtenir la récompense, l'action pour se la procurer et la consommer. La sensation de plaisir ressentie lors de la rencontre avec la récompense constitue la première étape des apprentissages motivés et va engendrer le désir de l'obtenir à nouveau. L'acquisition subséquente de ces apprentissages nécessite d'associer la récompense à des indices environnementaux qui sont prédictifs de sa présence et à une séquence motrice permettant de l'obtenir. Enfin, l'attribution d'une valeur motivationnelle à la récompense permet à l'individu de comparer différentes récompenses et de sélectionner une action parmi différentes options. Un modèle est ainsi proposé dans lequel la réponse à des récompenses comporte trois composantes: l'émotion ressentie au contact de la récompense, l'apprentissage des indices et actions qui permettent de l'obtenir et l'attribution d'une valeur motivationnelle distincte à chaque récompense (Berridge and Robinson, 2003).

b. Les circuits de la récompense

L'attribution de valeurs émotionnelles aux stimuli et l'acquisition d'apprentissages motivés requièrent des systèmes neuronaux capables de répondre aux récompenses et de modifier la réponse de l'individu en fonction de celles-ci. La mise en évidence de tels systèmes a débuté avec les travaux de Olds et Milner qui ont montré que des rats retournent volontairement dans des régions de l'environnement où ils ont reçu une stimulation de certaines régions cérébrales (Olds and Milner, 1954). Des études ont ensuite montré que des rats implantés avec des

électrodes délivrant une stimulation électrique faible dans des régions cérébrales spécifiques sont capables de s'auto-stimuler en appuyant sur un levier de façon répétée (Beninger et al., 1977). L'auto-stimulation chez le rat est accrue lorsque les électrodes sont implantées dans des régions riches en corps cellulaires dopaminergiques (Corbett and Wise, 1980). Le rôle majeur des projections dopaminergiques dans les apprentissages motivés par la récompense a ensuite été établi au travers de nombreuses études (Yokel and Wise, 1975, Wise and Schwartz, 1981, Wise, 2005).

L'acquisition des apprentissages motivés requiert des circuits neuronaux capables d'intégrer l'ensemble des informations sensorielles, motrices et émotionnelles impliquées dans les réponses adaptatives aux récompenses. Les circuits de récompense sont ainsi caractérisés par une interaction complexe entre les aires corticales et associatives, impliquées dans le traitement des informations émotionnelles, et les aires sensori-motrices ainsi qu'avec les régions hypothalamiques qui renseignent sur les paramètres physiologiques (Swanson, 2000). D'un point de vue anatomique, les systèmes de récompense regroupent des réseaux neuronaux interconnectés comprenant l'amygdale, l'hippocampe et le système dopaminergique méso-cortico-limbique issu de l'ATV et la SNc projetant vers le cortex et le striatum (**Figure 1**). L'interaction étroite et réciproque entre ces régions limbiques et décisionnelles avec les structures diencephaliques impliquées dans les fonctions autonomes sous-tend le contrôle étroit des états motivationnels et la capacité à adapter efficacement ces réponses comportementales au cours de la vie. Les comportements motivés sont modulés par l'expérience au travers de processus d'apprentissages qui reposent en grande partie sur l'importante plasticité des réseaux cortico-striataux. Ces circuits glutamatergiques sont fortement et durablement impactés par l'activité via des mécanismes de plasticité synaptiques à long terme dépendant du glutamate et de la DA.

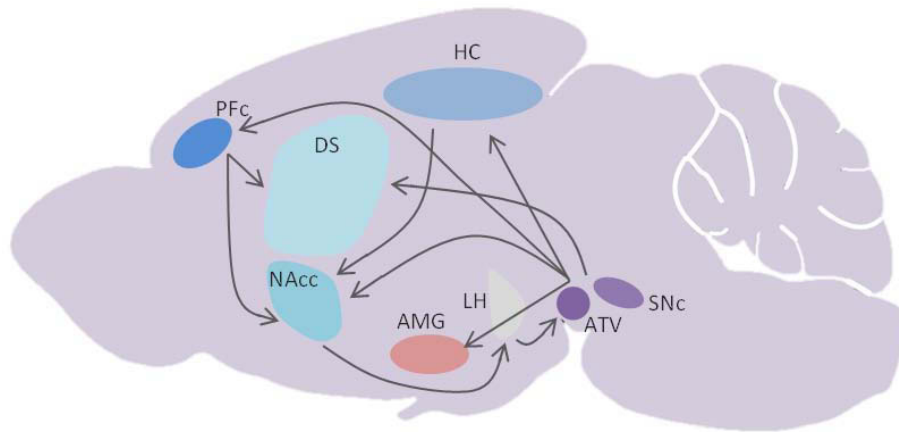


Figure 1 : Illustration schématique des structures et connexions impliquées dans les circuits de récompense

Le système dopaminergique méso-corticolimbique issu du mésencéphale envoie des projections depuis l'aire tegmentale ventrale (ATV) et la substance noire compacte (SNc) vers l'hippocampe (Percipalle et al.), l'amygdale (AMG), le cortex préfrontal (PFC), le noyau accumbens (Percipalle et al.) et le striatum dorsal (DS). Les connexions majeures entre ces différentes structures sont représentées ici. Les systèmes de récompense regroupent l'ensemble de ces régions cérébrales interconnectées.

c. La dopamine

Parmi les substrats moléculaires des apprentissages motivés par la récompense, la dopamine (DA) joue un rôle majeur. Cette molécule neuromodulatrice, libérée par diffusion volumique dans le cerveau, régule de nombreux comportements tels que l'attention et la mémoire de travail, la prise de décision, le contrôle de la motricité. Des dysfonctionnements du système dopaminergique ont été mis en cause dans différentes pathologies incluant entre autres la maladie de Parkinson, la schizophrénie ou encore le syndrome de Gilles de la Tourette (Nieoullon, 2002).

L'innervation dopaminergique du cerveau émane de noyaux regroupés en différents systèmes fonctionnels dans le mésencéphale, le diencephale (hypothalamus) ainsi que le tubercule olfactif et la rétine. Le système dopaminergique mésencéphalique est principalement impliqué dans la régulation des fonctions cognitives et motrices. Dans cette région, les corps cellulaires dopaminergiques sont regroupés dans la substance noire compacte (SNc), l'aire tegmentale ventrale (ATV) et l'aire rétro-rubrale (RR) formant une population d'environ 30000 neurones dopaminergiques dans le cerveau de souris. Bien que restreinte, cette population neuronale projette vers de multiples structures cibles et module ainsi l'activité de nombreuses régions cérébrales. L'anatomie de ces voies de projection reflète la diversité qui existe au sein des

neurones dopaminergiques du mésencéphale et il est possible de distinguer ces neurones en fonction de leurs structures cibles. On distingue ainsi trois grandes voies de projection issues du mésencéphale. La voie nigro-striée émane de la SNc et innerve principalement les régions dorsales du striatum. En modulant l'activité des neurones de cette structure, la voie nigro-striée participe au contrôle de la motricité (Graybiel, 1990). La voie méso-limbique est formée des projections issues de l'ATV vers les structures limbiques telles que les régions ventrales du striatum (noyau accumbens, NAcc), le tubercule olfactif ou encore le septum et l'amygdale. Enfin la voie méso-corticale comprend les projections de l'ATV vers les aires corticales telles que le cortex préfrontal, enthorinal ou encore cingulaire (Taber et al., 2012) (Figure 2). La composante limbique des projections de l'ATV est associée à la régulation de la motivation alors que les afférences corticales sont engagées dans la mémoire de travail et l'attention. L'ensemble du réseau ciblé par l'ATV forme le système méso-cortico-limbique, important pour les réponses émotionnelles, la motivation et les processus d'apprentissages récompensés (Kalivas and Nakamura, 1999). L'intégration des informations cortico-limbiques au sein de ce système joue un rôle majeur dans l'attribution des valeurs motivationnelles aux stimuli récompensants et dans les apprentissages motivés par la récompense (Everitt and Wolf, 2002, Kalivas and Volkow, 2005).

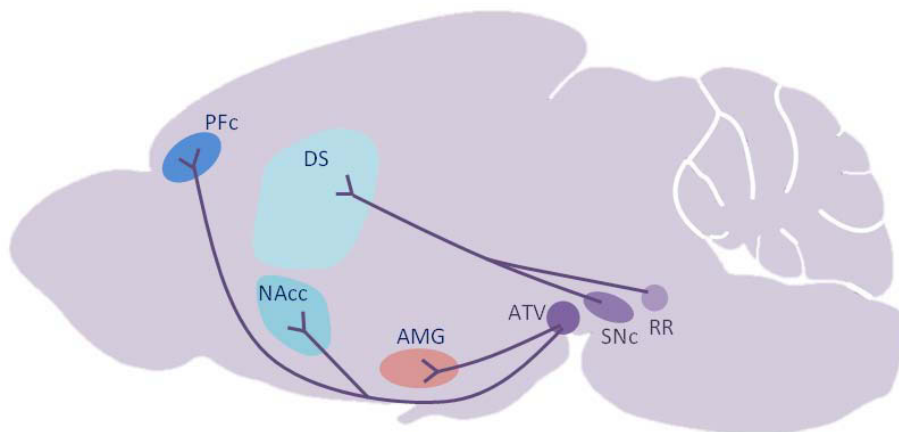


Figure 2 : Illustration des voies dopaminergiques mésencéphaliques

Les neurones dopaminergiques de l'aire tegmentale ventrale (ATV) projettent vers l'amygdale et le noyau accumbens (voie méso-limbique) et vers le cortex préfrontal (voie méso-corticale). Les neurones issus de la substance noire compacte (SNc) et l'aire rétro-rubrale projettent vers le striatum dorsal (voie nigro-striée). PFc, cortex préfrontal ; DS, striatum dorsal ; NAcc, noyau accumbens ; AMG, amygdale ; ATV, aire tegmentale ventrale ; SNc, substance noire compacte, RR aire rétro-rubrale.

Le contrôle de l'activité des neurones dopaminergiques est central pour la régulation des fonctions cérébrales modulées par ce système. Les neurones de l'ATV et de la SNc sont ciblés par de nombreuses afférences et intègrent une grande diversité d'informations en provenance des aires somatosensorielles, motrices et autonomes (Watabe-Uchida et al., 2012). Au-delà de la diversité de leurs projections, les neurones de l'ATV et de la SNc semblent également se distinguer par le type d'afférences qu'ils reçoivent. Il a ainsi été montré que les neurones dopaminergiques de la SNc reçoivent des afférences excitatrice majeure des cortex moteur et somatosensoriel ainsi que du noyau sous-thalamique alors que les neurones de la VTA reçoivent majoritairement des afférences provenant de l'hypothalamus latéral (Watabe-Uchida et al., 2012). Une étude récente suggère cependant que les neurones dopaminergiques du mésencéphale se distinguent, en fait, principalement par leurs régions de projections et reçoivent des afférences très similaires (Menegas et al., 2015). D'après cette étude, une seule population neuronale se distinguerait clairement par sa connectivité, il s'agit d'une sous-population de neurones dopaminergiques projetant vers la région postérieure du striatum. Ces neurones se démarquent par une très faible innervation en provenance du striatum ventral au profit d'une plus forte innervation par le globus pallidus, le noyau sous-thalamique et la *zona incerta*. Il semble également exister une diversité de connectivité au sein même de l'ATV où les neurones qui projettent vers les régions latérales du NAcc reçoivent une innervation préférentielle du noyau tegmental latéro-dorsal alors que les neurones projetant vers le cortex préfrontal médian reçoivent une innervation majoritaire de l'habenula (Lammel et al., 2012). Cette étude montre que l'activation des afférences en provenance du noyau tegmental latéro-dorsal est spécifique des comportements de récompense alors que les afférences provenant de l'habenula sont associées à des comportements d'aversion. Ces différences de connectivité pourraient ainsi définir des populations neurones engagés spécifiquement dans certaines composantes des comportements motivés suggérant qu'il existe des circuits spécifiques de chacune de ces signatures motivationnelles au sein de l'ATV (Lammel et al., 2012).

d. Dopamine et apprentissages motivés

De nombreuses études ont montré que les récompenses naturelles et artificielles exercent leur effet sur le comportement en augmentant la concentration en DA dans le NAcc (Wise and Bozarth, 1987, Di Chiara and Imperato, 1988). La DA ne semble pas directement responsable de la sensation de plaisir associée aux récompenses puisqu'il est possible d'induire une

préférence hédonique dans des modèles animaux d'inhibition pharmacologique ou génétique de la libération de DA (Berridge and Robinson, 1998, Cannon and Palmiter, 2003, Robinson et al., 2005). Il apparaît cependant que la DA occupe une place centrale dans les apprentissages motivés par la récompense où sa fonction s'est, en effet, avérée plus complexe qu'un simple signal de récompense (Schultz et al., 1997, Schultz, 2006). Les travaux de Schultz et ses collaborateurs montrent que les neurones dopaminergiques sont activés en réponse à une récompense inattendue mais leur réponse se modifie au fur et à mesure que le singe apprend à reconnaître le signal qui prédit la récompense. L'activation des neurones par la récompense elle-même diminue alors au profit d'une augmentation de leur activité lors de la présentation d'un stimulus associé à la récompense. La réponse des neurones est augmentée dans le cas d'une récompense plus importante qu'attendue et elle est, à l'inverse, diminuée en cas d'absence de la récompense attendue. Ces données ont conduit à l'hypothèse selon laquelle la libération de DA coderait pour une erreur de prédiction de la récompense qui correspond à la différence entre la récompense reçue et la récompense attendue. La libération de DA serait ainsi nécessaire pour l'attribution de valeurs motivationnelles aux récompenses et aux indices qui leur sont associés et agirait comme un signal d'apprentissage facilitant la consolidation de leur mémorisation. Dans ce contexte, la DA permet de relier les propriétés agréables d'une récompense avec la motivation à l'obtenir et joue ainsi un rôle central dans la formation des associations qui sous-tendent les apprentissages motivés par la récompense (Berridge and Robinson, 1998).

L'anatomie des projections dopaminergiques au sein des systèmes de récompense conduit à une libération large et diffuse de DA à partir d'un petit nombre de noyaux dopaminergiques. Cette architecture caractéristique des systèmes neuromodulateurs confère à la DA la possibilité de coordonner l'activité des différentes structures cérébrales des systèmes de récompense. La DA modulerait ainsi la valeur motivationnelle des récompenses en interagissant avec des circuits qui encodent des informations sensorielles et motrices associées à ces récompenses. Au sein des différentes structures des circuits de récompense, la modulation de la transmission glutamatergique, par le système dopaminergique, joue un rôle majeur dans les mécanismes de plasticité neuronale qui sous-tendent l'acquisition des apprentissages motivés par la récompense (Berke and Hyman, 2000, Reynolds and Wickens, 2002, Kalivas et al., 2006).

2. L'addiction, une forme d'apprentissage pathologique

De nombreuses substances psychoactives naturelles ou artificielles peuvent faire l'objet d'un usage répété du fait notamment des sensations positives que procure leur consommation. Cependant, chez des individus vulnérables, l'usage répété de ces substances peut conduire à la mise en place d'un état pathologique, l'addiction, caractérisé par une perte de contrôle de la consommation de la substance malgré de nombreuses conséquences néfastes dans la vie de l'individu. Les comportements compulsifs et centrés sur la recherche et la consommation de la drogue, caractéristiques de cette maladie, sont le reflet d'une forme de motivation extrême et pathologique à obtenir une substance ayant acquis une valeur hédonique anormalement élevée. L'addiction apparaît ainsi comme une forme d'apprentissage pathologique résultant d'un détournement des processus neuronaux normalement impliqués dans les comportements motivés et la mise en place des apprentissages liés à la récompense.

a. Définition de l'addiction

L'addiction est un état pathologique qui se caractérise par la recherche et la prise compulsives de drogue, l'incapacité à contrôler la dose absorbée et l'émergence d'un état émotionnel négatif (anxiété, irritabilité) lorsque l'accès à la drogue est limité ou impossible (Koob, 2006). D'un point de vue clinique, la consommation de drogue dite récréative, qui est occasionnelle et contrôlée, se distingue de l'addiction qui est, elle, associée à une escalade incontrôlée de la consommation et une recherche chronique et compulsive de la substance. L'addiction se développe chez certains individus qui ont initialement consommé la drogue dans un cadre festif dans le but de se procurer des sensations plaisantes. Chez ces individus vulnérables, l'exposition répétée aux drogues induit des adaptations neuronales qui conduisent à la mise en place de la tolérance et de la dépendance responsables de l'escalade de la consommation ainsi que de la sensation de manque en l'absence de drogue.

On peut ainsi considérer que les drogues, initialement consommées en vue d'obtenir une sensation positive, sont ensuite consommées, dans le cas de l'addiction, pour échapper aux sensations négatives causées par le manque (Koob and Le Moal, 1997, Robinson and Berridge, 2003). Dans l'addiction, la drogue acquiert une valeur positive anormalement élevée et sa recherche, ainsi que sa consommation, prennent le pas sur de nombreux objectifs de la vie de l'individu. L'addiction se définit ainsi comme une prise excessive et compulsive

de drogue en dépit des souffrances physiques, psychiques et sociales qu'elle entraîne chez l'individu (Deroche-Gamonet et al., 2004). Si certains sujets parviennent à contrôler ou stopper leur consommation, dans la majorité des cas, l'addiction est une pathologie chronique présentant un risque élevé de rechute. Ce risque persiste extrêmement longtemps après l'arrêt de la drogue, parfois même après que toute sensation de manque a disparu (McLellan et al., 2000). Ceci pose de nombreuses questions quant à la persistance des adaptations cérébrales pathologiques induites par les drogues. L'identification des mécanismes neuronaux impliqués dans des changements comportementaux durables est une étape clé dans la compréhension de la physiopathologie de l'addiction et de la rechute. Les enjeux majeurs de la recherche en neurobiologie dans le domaine de l'addiction consistent à élucider les mécanismes cellulaires et moléculaires qui sous-tendent la transition d'un usage récréatif vers une prise compulsive ainsi que les substrats neuronaux engagés à long terme dans les rechutes chroniques.

b. Modélisation de l'addiction chez le rongeur

La modélisation de l'addiction chez l'animal est un outil primordial pour l'investigation des processus neurobiologiques impliqués dans cet état pathologique. Cette approche requiert de pouvoir reproduire les altérations comportementales caractéristiques de l'addiction chez l'animal de laboratoire. Si aucun modèle ne récapitule intégralement la pathologie humaine, chacun d'entre eux permet d'approcher un ou plusieurs éléments du processus d'addiction. L'établissement d'un apprentissage associatif entre des éléments du contexte, la disponibilité de la drogue et la réponse comportementale requise pour y accéder est un élément clé dans la mise en place de l'addiction. Ainsi, une base commune à ces modèles est leur capacité à reproduire le renforcement qu'exerce la drogue sur certaines réponses comportementales favorisant l'accès à cette dernière. Un autre intérêt majeur des modèles animaux est qu'ils offrent la possibilité d'étudier la transition d'un état naïf vers la consommation compulsive au contraire des études cliniques qui impliquent des individus déjà engagés dans la pathologie (Robbins and Everitt, 2002)

Le modèle d'auto-administration est un test de conditionnement opérant qui utilise les propriétés motivationnelles des drogues comme renforcement positif. Les récompenses naturelles comme les drogues ont la propriété de favoriser les réponses comportementales qui permettent leur obtention du fait notamment de la valeur positive qui leur est associée (Cardinal and Everitt, 2004). Ce protocole modélise la capacité à mémoriser et reproduire une

séquence motrice favorisée par l'association entre la tâche comportementale et sa conséquence hédonique. Dans ce protocole opérant, l'animal déclenche volontairement l'administration de la drogue en réalisant une tâche comportementale précise telle qu'une pression sur un levier ou le positionnement de son museau dans un trou. La drogue est délivrée soit par voie intraveineuse au travers d'un cathéter soit par voie intra-crâniale par infusion dans une canule. Les drogues que les animaux s'auto-administrent correspondent à celles qui ont un haut potentiel addictif chez l'Homme et l'auto-administration est ainsi considérée comme un modèle prédictif du potentiel d'abus d'une drogue (Collins et al., 1984a). Ce test permet d'analyser différentes phases du processus d'addiction, des plus précoces avec la transition d'un état naïf vers une consommation compulsive, jusqu'aux altérations comportementales à très long terme observées dans la rechute. Dans ce test, l'évaluation de la réponse chez des rats a permis de modéliser la plupart des critères cliniques qui définissent l'addiction. Les sujets présentent une difficulté à limiter la consommation de la drogue et ne parviennent pas à stopper le comportement conditionné en l'absence de drogue. L'augmentation progressive de l'effort requis pour obtenir la drogue permet de mesurer la motivation de l'animal à consommer la substance. La poursuite de la consommation en présence d'un stimulus douloureux associé à la drogue reflète l'incapacité à stopper la drogue en dépit de ses conséquences néfastes. Enfin, la propension à la rechute est évaluée par la réexposition à des indices contextuels associés à la drogue après une longue période d'abstinence. Ce protocole opérant dans lequel l'animal s'administre lui-même la drogue permet également de modéliser la variabilité interindividuelle en termes de vulnérabilité et de mesurer la proportion de sujets qui basculent vers un comportement addictif (Deroche-Gamonet et al., 2004).

La préférence de place conditionnée (CPP) est un protocole non-opérant permettant d'évaluer les propriétés hédoniques d'une drogue au travers d'une procédure de conditionnement pavlovien classique. Dans ce test, l'animal explore deux environnements initialement neutres mais distinguables par des indices visuels et/ou tactiles et la drogue est administrée de façon répétée dans un des deux environnements de façon à ce qu'il soit associé à la drogue. L'animal est ensuite libre d'explorer chacun des environnements et la proportion du temps passé dans l'environnement associé à la drogue est un indice du renforcement positif qu'elle exerce. La préférence de place se manifeste par le fait que l'animal passe plus de temps dans le compartiment dans lequel il a reçu la drogue par rapport à un compartiment accessible de la même manière dans lequel il n'a pas reçu la drogue (Bardo and Bevins, 2000). Ce protocole

basé sur un apprentissage conditionné, permet d'évaluer l'impact du contexte sur la réponse comportementale.

La sensibilisation comportementale ou sensibilisation locomotrice correspond à une augmentation de la réponse locomotrice d'un animal au cours d'injection répétée d'une même dose de drogue. Cette sensibilisation de la réponse peut persister longtemps au-delà du sevrage, jusqu'à un an dans le cas de l'amphétamine (Paulson and Robinson, 1991). La capacité des drogues à modifier la réponse locomotrice de l'animal est fortement modulée par l'environnement dans lequel elle est administrée. La sensibilisation à la cocaïne ou l'amphétamine est atténuée lorsque la drogue est administrée dans la cage de stabulation en comparaison à l'injection dans un nouvel environnement spécifiquement associé à la drogue (Badiani et al., 1995). L'influence de l'environnement dépend de la dose administrée, de sorte qu'un nouvel environnement favorise la sensibilisation à des doses plus faibles de drogue, démontrant l'importance du contexte dans la capacité des drogues à modifier durablement les comportements (Browman et al., 1998). Selon la théorie de l'« incentive sensitization », la sensibilisation est une conséquence des adaptations neuronales induites par les drogues dans les circuits de récompense et reflète le développement d'une hyper-sensibilité de ces circuits au fil des expositions à la drogue. Ainsi, la sensibilisation locomotrice ne serait pas une simple modification de la réponse locomotrice de l'animal mais l'expression d'un changement de la valeur motivationnelle attribuée à la drogue et aux indices contextuels qui lui sont associés (Robinson and Berridge, 2001, 2008).

c. Détournement des circuits de récompense par les drogues

De la définition clinique de la pathologie jusqu'à sa modélisation chez l'animal, la recherche compulsive de la drogue et sa consommation incontrôlée occupent une place centrale dans l'addiction. Ces comportements sont une conséquence des propriétés renforçantes des substances toxicomanogènes. Du fait de leur capacité à induire des émotions positives et à réduire les états émotionnels négatifs, les drogues produisent une sensation artificielle de bénéfice (Nesse and Berridge, 1997) et sont ainsi interprétées comme intrinsèquement positives et récompensantes. La recherche de la sensation plaisante associée à la substance conduit à une répétition des comportements permettant de l'obtenir qui reflète l'acquisition de propriétés renforçantes par les drogues. Les substances addictives diffèrent cependant des récompenses naturelles par deux aspects fondamentaux qui sont à l'origine de leur potentiel

pathologique. D'une part, la surévaluation de leur valeur hédonique au détriment des récompenses naturelles tend à restreindre l'activité de l'individu autour de la recherche et la consommation compulsive de la drogue. Ces comportements sont soumis à une pression motivationnelle intense et deviennent largement favorisés au détriment de nombreux autres objectifs parfois vitaux (Bozarth and Wise, 1985). D'autre part, à l'inverse des récompenses naturelles, les drogues renforcent des comportements qui ne présentent pas de bénéfice immédiat pour le fonctionnement physiologique de l'individu et la survie de l'espèce.

Les propriétés renforçantes et récompensantes acquises par les substances addictives reflètent leur capacité à interférer avec le traitement des informations émotionnelles et motivationnelles au sein des systèmes de récompense. Nous avons vu précédemment que la DA joue un rôle clé dans les processus motivationnels et les apprentissages liés à la récompense. Bien qu'ayant des mécanismes d'action variés, les substances toxicomanogènes partagent la propriété commune d'augmenter la concentration en DA dans les régions mésolimbiques et en particulier dans la partie ventrale du striatum, le NAcc (Di Chiara and Imperato, 1988). Contrairement aux récompenses naturelles, les drogues activent la transmission dopaminergique, mimant ainsi l'effet d'un stimulus renforçant qui procure une récompense plus grande qu'attendue. Elles vont ainsi détourner le fonctionnement des circuits de récompense et acquérir une valeur hédonique supérieure à la plupart des autres récompenses naturelles. Ceci conduit à la mise en place de conditionnements et d'apprentissages par renforcement liés à la consommation de la substance qui témoignent de l'impact durable des drogues sur le fonctionnement de ces circuits.

La persistance des adaptations comportementales observées dans l'addiction comme dans les modèles animaux reflète l'implication des processus d'apprentissage et de consolidation de mémoires associées à la drogue. Le risque de rechute à long terme est une composante majeure de la pathologie et de nombreuses études montrent que ces rechutes sont très souvent associées à la réexposition à des indices précédemment associés à la drogue (O'Brien et al., 1998, Tiffany, 1999). La composante chronique de la maladie résulterait ainsi d'un stockage durable de mémoires associatives mises en place au cours de l'exposition aux drogues. L'interférence des drogues avec les mécanismes d'apprentissages liés à la récompense apparaît aujourd'hui comme un élément clé de la physiopathologie de l'addiction (Kelley, 2004, Hyman et al., 2006). La perturbation durable de ces systèmes d'apprentissage repose sur la capacité des drogues à interagir avec des mécanismes de plasticité neuronale au sein de structures clés des systèmes de récompense.

3. Substrats neuronaux de l'addiction : focus sur le striatum

Les altérations comportementales à long terme qui caractérisent l'addiction reflètent l'établissement d'une forme de plasticité neuronale dépendante des drogues et pouvant persister au-delà même de l'arrêt de la consommation. Les substances addictives sont des composés chimiques capables d'interférer avec des mécanismes cellulaires et moléculaires importants pour les adaptations neuronales durables qui sous-tendent les processus d'apprentissage et de mémoire. Au sein des circuits de récompense, le striatum est une cible importante des projections dopaminergiques et représente un substrat neuronal clé des apprentissages liés à la récompense. La très grande plasticité des réseaux neuronaux impliquant le striatum permet une flexibilité importante des comportements motivés mais les rend également extrêmement sensibles aux drogues qui activent ces systèmes (Hyman et al., 2006). En augmentant systématiquement la transmission dopaminergique, les drogues modifient le fonctionnement de ces réseaux et induisent la mise en place d'une plasticité durable au sein des neurones striataux.

a. Le striatum

Le striatum est une région sous-corticale qui appartient au système des ganglions de la base dont il constitue la structure d'entrée. Les ganglions de la base sont formés d'un ensemble de noyaux situés en profondeur des hémisphères cérébraux : le striatum (caudé-putamen et noyau accumbens), le pallidum ou globus pallidus composé d'un segment médian ou interne (GPi) et d'un segment latéral ou externe (GPe), la substance noire formée d'une partie compacte (SNc) et réticulée (SNr) et le noyau sous-thalamique (NST). Ce système appartient à des circuits ou boucles reliant le cortex au thalamus qui projette en retour vers les aires corticales ainsi que vers des régions motrices du tronc cérébral (Alexander et al., 1990, Haber, 2003) (Figure 3). Les boucles cortico-striato-thalamo-corticales sont impliquées dans la régulation de la motricité volontaire, la sélection de l'action, les apprentissages procéduraux ainsi que les apprentissages conditionnés ou encore le traitement de la récompense (Kimura, 1995, Wise et al., 1996, Balleine et al., 2007). D'après le modèle courant de fonctionnement des ganglions de la base, on distingue deux boucles parallèles de transmission de l'information qui divergent lors de leur passage dans le striatum pour former la voie directe et la voie indirecte (Albin et al., 1989, Kreitzer and Malenka, 2008, Valjent et al., 2009). Ces deux voies exercent des actions opposées sur le contrôle du mouvement. La voie directe ou striato-nigrale comprend

les projections directes du striatum vers le GPi et la SNr qui projettent ensuite vers les centres moteurs du thalamus. La voie indirecte, ou striato-pallidale, fait intervenir deux structures intermédiaires, les informations sont transmises vers le GPe puis le STN avant d'atteindre les noyaux de sortie des ganglions de la base (GPi et SNr). De manière schématique, l'activation de la voie directe aboutit à une levée d'inhibition des projections thalamo-corticales qui est associée à une facilitation de l'action alors que l'activation de la voie indirecte conduit à une inhibition du mouvement par renforcement de l'inhibition issue des projections thalamo-corticales (Kravitz et al., 2010). L'équilibre entre ces deux voies semble crucial pour l'initiation de l'action et le contrôle fin de la motricité. Des données récentes indiquent que l'activation concomitante des deux voies serait nécessaire à la sélection de l'action qui serait modulée par le niveau d'activation spécifique de chacune d'entre elle (Cui et al., 2013)

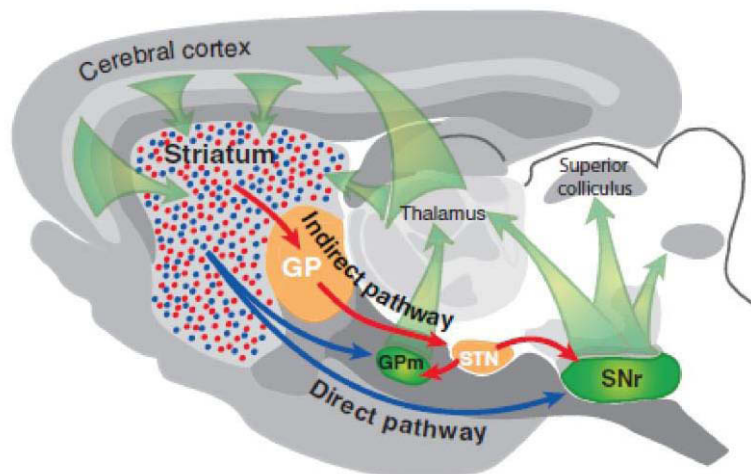


Figure 3 : Représentation schématique des voies directes et indirectes du striatum au sein des ganglions de la base

Le cortex cérébral et le thalamus envoient des projections excitatrices vers le striatum, principale structure d'entrée des ganglions de la base. Les noyaux de sortie des ganglions de la base sont le globus pallidus interne ou médian (GPi) et la substance noire réticulée (SNr) qui projettent vers le thalamus. Celui-ci projette en retour vers les aires frontales du cortex cérébral. La voie directe est constituée des axones issus des neurones de projection du striatum (bleu) innervant directement les noyaux de sortie, GPi et SNr. La voie indirecte est constituée des neurones striato-pallidaux (rouge) projetant vers le globus pallidus externe (GPe). Les neurones du GPe projettent quant à eux vers le noyau sous-thalamique (STN), qui projette à son tour vers le GPi et la SNr. Ainsi les neurones striato-pallidaux sont connectés indirectement, via le GPe et le STN, aux noyaux de sortie des ganglions de la base. (Gerfen, 2006)

b. Les neurones du striatum

i. Les neurones épineux moyens (MSN)

Les voies anatomiques décrites dans la section précédente sont principalement composées des neurones épineux moyens du striatum (MSN, medium-sized spiny neurons) qui constituent les neurones de projection du striatum. Ces neurones GABAergiques représentent la population neuronale majoritaire du striatum (environ 95%). Comme leur nom l'indique, les MSN sont caractérisés par un soma de taille moyenne (10-20µm) et une forte densité d'épines dendritiques (**Figure 4**). L'ensemble des MSN expriment la GAD (Acide glutamique décarboxylase) qui est l'enzyme de synthèse du GABA (acide gaba-amino-butérique). On distingue deux sous-types de MSN selon le type de récepteurs dopaminergiques qu'ils expriment, les neuropeptides qu'ils libèrent et leurs projections axonales ([Gerfen et al., 1990](#)).

Les MSN qui prennent part à la voie directe, les MSN striato-nigraux ou MSN-D1, expriment majoritairement les récepteurs D1 dopaminergiques, les récepteurs muscariniques de type 4 (M4) ainsi que les neuropeptides substance P et dynorphine. Les neurones de la voie indirecte, neurones striato-pallidaux ou MSN-D2, expriment majoritairement les récepteurs D2 dopaminergiques, les récepteurs A2A de l'adénosine et l'enképhaline ([Gerfen and Young, 1988](#), [Graybiel, 1990](#), [Smith and Bolam, 1990](#)). Les MSN D1 engagés dans la voie directe, projettent directement sur les noyaux de sortie des ganglions de la base (SNr et GPi) alors que les MSN D2 de la voie indirecte projettent vers le GPe. Cette ségrégation ne semble cependant pas exclusive puisqu'il a été montré que certaines collatérales d'axones des MSN de type D1 projettent vers le GPe ([Lévesque et al., 2003](#), [Matamalas et al., 2009](#)). Ces collatérales d'axones qui permettent d'établir un « pont » entre les voies directe et indirecte semblent jouer un rôle important dans leur action synergique. La mise en place de ces collatérales apparaît comme un mécanisme dynamique par lequel la voie directe module l'activité de la voie indirecte et contribue à maintenir l'équilibre entre ces voies dans la mise en place des comportements ([Cazorla et al., 2014](#)). Cette étude montre que l'activité neuronale des D2R-MSN régule la densité de ces collatérales émises vers le GPe par les D1R-MSN puisque celle-ci est augmentée lors d'une activation accrue de la voie indirecte et diminuée par une inhibition de la voie indirecte ([Cazorla et al., 2014](#)). L'augmentation de la densité des collatérales est associée à une diminution de l'activité locomotrice induite par

l'activation de la voie directe démontrant l'importance de cette voie de communication dans la régulation des comportements.

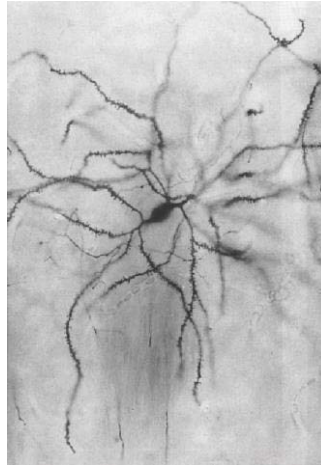


Figure 4 : Neurone épineux moyen du striatum

Ce neurone épineux moyen du striatum est révélé par la méthode de Golgi. Ce marquage révèle la grande densité d'épines au niveau des dendrites du neurone. (Smith and Bolam, 1990)

ii. Les interneurones

Si la majorité des neurones striataux est représentée par les neurones GABAergiques de projection que sont les MSN, décrits précédemment, le striatum comprend également une petite population d'interneurones non épineux qui jouent un rôle important dans la régulation de l'activité des MSN (Tepper and Bolam, 2004). Ces interneurones peuvent être GABAergiques ou cholinergiques et représentent 5 à 25% des neurones striataux selon les espèces (Graveland and DiFiglia, 1985).

Les interneurones GABAergiques sont divisés en trois groupes en fonction de leurs propriétés histochimiques. On distingue les interneurones exprimant la parvalbumine (IN-PV) majoritairement présents dans la partie dorsale du striatum, les interneurones qui synthétisent la somatostatine, le neuropeptide Y et l'oxyde nitrique synthase, retrouvé principalement dans la région ventrale du striatum et les interneurones à calrétinine localisés dans la partie dorso-médiane du striatum (Kita and Kitai, 1990, Kawaguchi et al., 1995). L'activité des interneurones GABAergiques est régulée par la DA au travers de récepteurs dopaminergiques de type D1R dont la stimulation conduit à leur dépolarisation rapide (Bracci et al., 2002, Centonze et al., 2002). La stimulation des récepteurs dopaminergiques D2R pourrait

également réguler leur activité au niveau présynaptique en favorisant l'inhibition de la libération de GABA par ces interneurons (Centonze et al., 2003). Les interneurons GABAergiques pourraient ainsi jouer un rôle important dans la régulation temporelle de l'émission d'un potentiel d'action par les MSN (Tepper and Bolam, 2004).

Les interneurons cholinergiques se distinguent par un grand corps cellulaire, une arborisation axonale dense et une activité tonique in vivo (TAN, Tonicallly Activated Neurons). Ces interneurons expriment la choline acetyl transférase (ChAT), l'enzyme de synthèse de l'acétylcholine (ACh) ainsi que l'acétylcholinestérase (AChE), l'enzyme de dégradation de l'ACh. Les interneurons cholinergiques expriment également de nombreux récepteurs dont les récepteurs de la DA, du glutamate et de l'adénosine entre autres (Tepper and Bolam, 2004, Lim et al., 2014). Ces interneurons expriment les D2R et les D5R et l'activation de ces récepteurs par la DA conduit à une diminution de l'activité des interneurons cholinergiques aboutissant à une suppression de la libération d'ACh (Aosaki et al., 1994). Le rôle des interneurons cholinergiques serait de moduler le seuil d'excitabilité des MSN en réponse aux influx corticaux ou thalamiques (Tepper and Bolam, 2004).

c. Les drogues augmentent la concentration extracellulaire en DA

Les drogues sont des composés chimiques qui modifient le fonctionnement du SNC en interférant avec la transmission synaptique chimique. Si les différentes classes de substances addictives ont des modes d'actions variables, elles partagent cependant la propriété commune d'augmenter la concentration extracellulaire en DA dans les aires mésolimbiques. Il est possible de regrouper les drogues en trois grandes catégories selon le mécanisme par lequel elles impactent la transmission dopaminergique (Luscher and Ungless, 2006). La première catégorie, comprend les opioïdes et les canabinoïdes qui activent les neurones dopaminergiques par désinhibition (i.e. inhibition des neurones inhibiteurs GABAergiques projetant sur les neurones dopaminergiques) en se fixant directement à des récepteurs couplés à une protéine G. La deuxième catégorie de drogues agit en se fixant sur des récepteurs ionotropiques ou sur des canaux ioniques et comprend la nicotine, l'alcool et les benzodiazépines. La dernière catégorie regroupe les psychostimulants qui augmentent la concentration extracellulaire en DA en agissant sur les transporteurs qui contrôlent la libération et/ou la recapture des monoamines. La catégorie des psychostimulants inclut la cocaïne, l'ecstasy et les amphétamines. Si la cocaïne interfère avec la recapture des différents

monoamines, à savoir la DA, la sérotonine et la noradrénaline, il apparaît cependant que ses propriétés renforçantes dépendent majoritairement de sa liaison au transporteur de la dopamine, le DAT (**D**opamine **A**ctive **T**ransporter) (Ritz et al., 1987, Chen et al., 2006).

Si les drogues affectent des systèmes neuromodulateurs divers dans différentes régions cérébrales, il apparaît cependant que les élévations de DA au sein du striatum jouent un rôle majeur dans les renforcements induits pas les récompenses naturelles comme par les drogues (Di Chiara and Imperato, 1988, Robbins and Everitt, 2002). Les substances addictives induisent des augmentations de la concentration DA plus intenses et plus longues que celles produites par un stimulus récompensant naturel. De cette façon, elles détournent l'information portée par la décharge phasique des neurones dopaminergiques en l'associant à une réponse post-synaptique plus importante qu'elle n'aurait dû être (Schultz, 2000). Le striatum est divisé en deux sous-régions, le striatum dorsal ou caudé-putamen formé d'une partie médiane (Striatum dorso-médian ou DM) et d'une partie latérale (Striatum dorso-latéral ou DL) et le striatum ventral ou NAcc, formé d'une coquille et d'un cœur (Voorn et al., 2004). Les drogues d'abus perturbent l'ensemble de la transmission dopaminergique et induisent ainsi des augmentations de DA dans l'ensemble du striatum. Il apparaît cependant que le NAcc, innervé par les projections dopaminergiques issues de la VTA, est plus spécifiquement impliquée dans les apprentissages renforcés et c'est dans cette région que les substances addictives induisent les plus nettes augmentations de DA (Di Chiara and Imperato, 1988, Di Chiara, 1998, Wise, 1998). L'amygdale et le cortex préfrontal également ciblés par les projections dopaminergiques de la VTA jouent un rôle important dans la mise en place des apprentissages associatifs (Everitt et al., 2003, Kalivas et al., 2005). L'amygdale participe à la mise en place des associations entre les indices et les récompenses et le cortex préfrontal contribue aux mécanismes de prise de décision importants pour l'initiation des comportements motivés. Ces structures projettent vers le NAcc qui intègre et relaie les différentes informations vers les structures de sortie des ganglions de la base impliquées dans la réponse motrice.

d. Le striatum, une structure de convergence

D'un point de vue anatomique, le striatum apparaît comme une structure de convergence recevant d'une part, les afférences glutamatergiques en provenance du cortex et du thalamus et d'autre part, les afférences dopaminergiques sous-corticales issues de la VTA et de la SNc.

(Kalivas and Nakamura, 1999) L'intégration des signaux glutamatergiques et DA dans les circuits cortico-striataux joue un rôle clé dans la mise en place de la plasticité à long terme et des apprentissages associatifs dépendants de la récompense (Berke and Hyman, 2000). Chacune des informations, glutamatergiques et dopaminergique est porteuse d'une partie des informations requises pour la mise en place des apprentissages et leur intégration dans le striatum permet leur association au cours du processus d'apprentissage. Les projections glutamatergiques issues du cortex encodent les signaux associés aux informations sensorielles, motrices, mnésiques alors que la libération de DA répond aux signaux non prédits saillants ou récompensant de l'environnement (Schultz, 2000). L'interaction de ces deux systèmes au sein du striatum est ainsi essentielle pour le traitement des informations au cours des apprentissages associatifs. L'acquisition et la mémorisation des apprentissages liés à la récompense reposent sur des mécanismes de plasticité neuronale partagés avec les autres formes d'apprentissages associatifs (Berke and Hyman, 2000, Everitt and Wolf, 2002). La modification des synapses glutamatergiques en réponse à l'activité neuronale est un des mécanismes majeurs de plasticité dans le système nerveux central (Malenka and Nicoll, 1999). Dans les circuits neuronaux de la récompense, la transmission glutamatergique joue un rôle majeur dans les processus d'adaptation physiologiques comme pathologiques dans l'addiction (Kalivas, 2004). Au sein de ces circuits, les afférences dopaminergiques modulent l'activité des synapses glutamatergiques et régulent ainsi les mécanismes cellulaires qui sous-tendent la plasticité neuronale.

Dans le striatum, le système dopaminergique exerce un effet modulateur central sur la transmission glutamatergique (Nicola et al., 2000, Wickens, 2009) (**Figure 5**). L'intégration des signaux dopaminergiques et glutamatergiques au niveau des MSN est centrale pour la mise en place de la plasticité neuronale qui sous-tend les apprentissages associatifs. En augmentant les taux de DA, les drogues d'abus détournent les mécanismes cellulaires qui régulent la transmission glutamatergique dans le striatum (Luscher and Malenka, 2011). Il est proposé que la convergence de ces signaux au sein des neurones agisse comme un détecteur de coïncidence dans les apprentissages associatifs (Sutton and Beninger, 1999, Reynolds and Wickens, 2002). Les terminaisons glutamatergiques forment des synapses asymétriques au niveau de la tête des épines alors que les synapses formées par les terminaisons dopaminergiques sont au niveau du cou ou de la base des épines. Cette proximité permet que la modulation dopaminergique s'exerce en aval de la transmission glutamatergique au sein des épines des MSN. L'interaction de ces deux systèmes dans les MSN semble jouer un rôle

majeur dans les changements comportementaux à long terme observés dans l'addiction (Kalivas and Duffy, 1995, Wolf, 1998).

Les modifications à long terme des circuits de la récompense rendent compte de l'impact durable des substances addictives sur le fonctionnement cérébral, au-delà de la cinétique d'augmentation de la DA (Luscher and Malenka, 2011). La plasticité neuronale induite par les drogues d'abus apparaît ainsi comme la base cellulaire des processus d'adaptations pathologiques des systèmes de récompense dans l'addiction. Cette plasticité dépend de la mise en place d'adaptations moléculaires et de changements d'expression de gènes impliqués dans des modifications durables du fonctionnement des MSN (Girault et al., 2007, Robison and Nestler, 2011). Les mécanismes cellulaires et moléculaires impliqués font l'objet du chapitre suivant avec un intérêt particulier pour la voie de signalisation intracellulaire ERK (Extracellular-signal Regulated Kinase) dont il a été montré qu'elle joue un rôle central dans les réponses aux drogues.

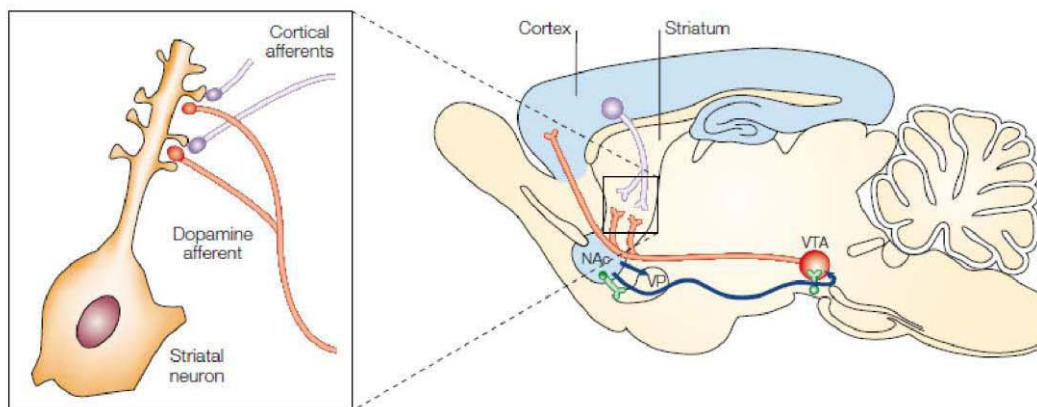


Figure 5 : illustration schématique des interactions entre les systèmes dopaminergiques et glutamatergiques dans le striatum

Les afférences glutamatergiques provenant du cortex et dopaminergiques en provenance de l'ATV (ici VTA, Ventral Tegmental Area) et de la SNc convergent au sein du striatum. Comme illustré dans l'encart, cette convergence est retrouvée au niveau des neurones épineux moyens du striatum (MSN) qui reçoivent des terminaisons dopaminergiques et glutamatergiques. La proximité de ces terminaisons au niveau des épines des MSN favorise l'intégration aux niveaux cellulaire et moléculaire des informations portées par ces deux types d'afférences (Hyman et al., 2006).

Chapitre II. Bases moléculaires de l'addiction

L'addiction est une maladie chronique, sous-tendue par des modifications persistantes des réseaux neuronaux impliqués dans les processus de récompense. La mise en place de cet état pathologique repose sur la capacité des drogues à détourner les circuits de récompense en agissant sur la modulation dopaminergique, essentielle à leur fonctionnement.

L'addiction apparaît comme une forme pathologique d'apprentissage qui repose sur des mécanismes de plasticité neuronale très largement partagés avec les processus normaux d'apprentissage et de mémoire. En modifiant la concentration extracellulaire en DA, les drogues impactent la signalisation intracellulaire en aval de ce neuromodulateur et les mécanismes de plasticité neuronale qui en dépendent. Les adaptations cellulaires et moléculaires induites par les drogues au sein des neurones du système de récompense jouent un rôle central dans la mise en place des altérations comportementales à long terme observées dans l'addiction ([Robison and Nestler, 2011](#)).

La plasticité neuronale reflète la capacité des neurones à modifier durablement leur fonctionnement en réponse à des signaux électriques ou chimiques spécifiques. Ces adaptations à long terme dépendent de modifications de la composition moléculaire des neurones au travers de régulations géniques importantes pour la synthèse de nouvelles protéines ([Kandel, 2001](#)). Les voies de signalisation intracellulaires jouent un rôle important dans la plasticité neuronale en permettant un couplage efficace entre l'activité synaptique induite par les signaux extracellulaires et l'initiation d'événements intracellulaires qui sous-tendent les changements durables du fonctionnement neuronal. Bien qu'ayant des modes d'action différents, les drogues d'abus, induisent des adaptations moléculaires très similaires en agissant sur des voies de signalisation communes ([Nestler, 2005](#)). Ce chapitre abordera plus particulièrement l'implication des protéines de la voie des ERK, activée par les drogues dans les circuits de récompense. Dans le striatum, la voie ERK activée en aval des D1R (Récepteur dopaminergiques de type D1) et NMDAR est un substrat moléculaire important pour l'intégration de signaux dopaminergiques et glutamatergiques au sein des MSN ([Girault et al., 2007](#)). L'activation de cette voie joue un rôle majeur dans le développement des adaptations neuronales et comportementales induites par les drogues ([Lu et al., 2006](#)).

1. La voie ERK

La voie ERK appartient au groupe des voies de signalisation de type MAPK (Mitogen Activated Protéine Kinase). Ces voies de transduction intracellulaires sont impliquées dans la propagation de signaux de la membrane vers le noyau et participent aux mécanismes de régulations géniques dépendants de l'activité neuronale. Trois grandes familles de MAPK ont été décrites à ce jour : la famille des MAPK/ERK, la famille des MAPK/JNK (c-Jun N-terminal Kinase) et la famille des MAPK/p38 (Derkinderen et al., 1999, Raman et al., 2007).

Dans les cellules non-neuronales, les MAPK sont impliquées dans les processus de prolifération, de différenciation et de survie (Volmat and Pouyssegur, 2001). Dans les neurones post-mitotiques du SNC, les protéines ERK sont abondamment exprimées (Fiore et al., 1993, Hollister et al., 1997). Dans cette partie, seules les données concernant la voie ERK au sein des neurones seront abordées. S'il existe huit isoformes de ERK (ERK1-8), ERK1 et ERK2 restent les mieux décrites dans le SNC. ERK1/2 sont exprimées de manière ubiquitaire dans le cerveau, avec un niveau d'expression variable des deux isoformes selon les régions cérébrales (Ortiz et al., 1995). Dans les neurones, les ERK1/2 sont localisées et activées dans les dendrites, le soma, le noyau et les terminaisons axonales (Hyman et al., 1994, Ortiz et al., 1995). ERK est activée par de nombreux stimuli extracellulaires agissant sur des récepteurs de type ionotrophique ou métabotrophique. La voie ERK intervient dans un très grand nombre de fonctions cellulaires telles que la survie neuronale mais aussi dans la mise en place d'adaptations cellulaires durables importantes pour la plasticité neuronale (Sweatt, 2004, Thomas and Huganir, 2004)

Les MAPK de type ERK sont phosphorylées en réponse à des signaux extracellulaires spécifiques, par l'activation séquentielle de différentes protéines kinases, dont principalement la cascade Ras-Raf-MEK, immédiatement en amont des ERK. L'initiation de cette cascade de signalisation débute à la membrane par l'activation d'une petite protéine G qui active la première kinase en amont, à savoir la MAPK/ERK-kinase-kinases (MEKK) Raf, principalement B-Raf ou Raf-1 dans le cerveau. Les MEKK phosphorylent et activent les MAPK/ERK-kinases (MEK) qui activent à leur tour les MAPK par phosphorylation (**Figure 6**).

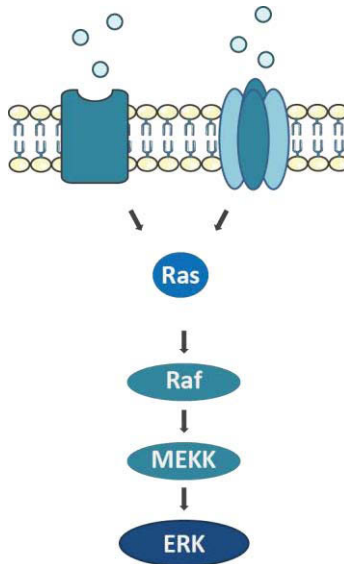


Figure 6 : Représentation simplifiée des étapes principales de la cascade de signalisation ERK

La voie ERK est activée en réponse à de nombreux stimuli extracellulaires agissant sur des récepteurs ionotropiques ou métabotropiques. Les MAPK de type ERK sont phosphorylées en réponse à des signaux extracellulaires spécifiques, par l'activation séquentielle de différentes protéines kinases, dont principalement la cascade Ras-Raf-MEK, immédiatement en amont des ERK. (voir texte pour plus de détails)

2. La voie ERK, une cible commune des drogues d'abus

L'activation de ERK par les drogues a initialement été décrite dans l'ATV chez le rat, suite à l'injection chronique de cocaïne ou de morphine (Berhow et al., 1995). Cette activation résulte d'un processus homéostatique impliquant le facteur neurotrophique BDNF (Brain Derived Neurotrophic Factor). La première démonstration de l'activation de ERK dans le striatum a été apportée par des travaux du groupe du Dr. Caboche qui ont montré que l'administration aiguë de cocaïne augmente le niveau de phosphorylation de ERK dans le striatum ventral et dorsal (Valjent et al., 2000). Cet événement survient de manière rapide et transitoire dans les neurones striataux et se maintient au cours d'un traitement chronique. L'activation de la voie ERK s'est ensuite révélée comme un mécanisme cellulaire commun à de nombreuses drogues telles que le cannabis, la d-amphétamine, la méthamphétamine, la morphine, la nicotine ou encore l'alcool (Valjent et al., 2001, Choe et al., 2002, Salzmänn et al., 2003, Valjent et al., 2004, Ibba et al., 2009).

L'analyse de différentes régions cérébrales a révélé l'existence d'un patron régional d'activation de ERK commun à de nombreuses drogues (Valjent et al., 2004) (Figure 7).

L'augmentation du niveau de phosphorylation de ERK dans le NAcc, la partie latérale du BNST (Bed Nucleus of Striata Terminalis), l'amygdale et le cortex préfrontal s'est avérée être une caractéristique commune à de nombreuses substances addictives (Valjent et al., 2004, Zhai et al., 2008). Ce patron d'activation n'est d'ailleurs pas retrouvé pour des substances stimulantes peu addictives telle que la caféine (Valjent et al., 2004). Dans la majorité de ces régions, l'activation de ERK dépend de la stimulation des D1R (Valjent et al., 2004). Cependant, dans certaines régions cérébrales, tel que le cortex préfrontal, l'activation de ERK s'est avérée indépendante des D1R et met en jeu les récepteurs β 1-adrénérgiques (Pascoli et al., 2005). Dans le striatum, l'activation de ERK en réponse à une injection unique de cocaïne ou d'amphétamine est restreinte aux MSN exprimant les D1R (Bertran-Gonzalez et al., 2008, Gerfen et al., 2008). A l'inverse, l'administration de l'halopéridol, un antagoniste des D2R (Récepteur dopaminergiques de type D2) conduit à une activation de ERK spécifiquement dans les MSN exprimant ce récepteur (Bertran-Gonzalez et al., 2008). La régulation opposée de l'activité de ERK entre les D1-MSN et les D2-MSN, en réponse à la cocaïne, a récemment été mise en évidence, *in vivo*, au travers d'une étude basée sur la détection par FRET (Förster Resonance Energy Transfer) de l'activité de ERK par micro-endoscopie chez l'animal vigile (Goto et al., 2015). Cette étude démontre que la dynamique de l'activation ERK, *in vivo*, est contrôlée de manière opposée par des stimuli récompensant ou aversifs puisque l'administration de cocaïne active ERK dans les D1-MSN et l'inhibe dans les D2-MSN alors que des chocs électriques déclenchent un profil d'activation de ERK en miroir (Goto et al., 2015).

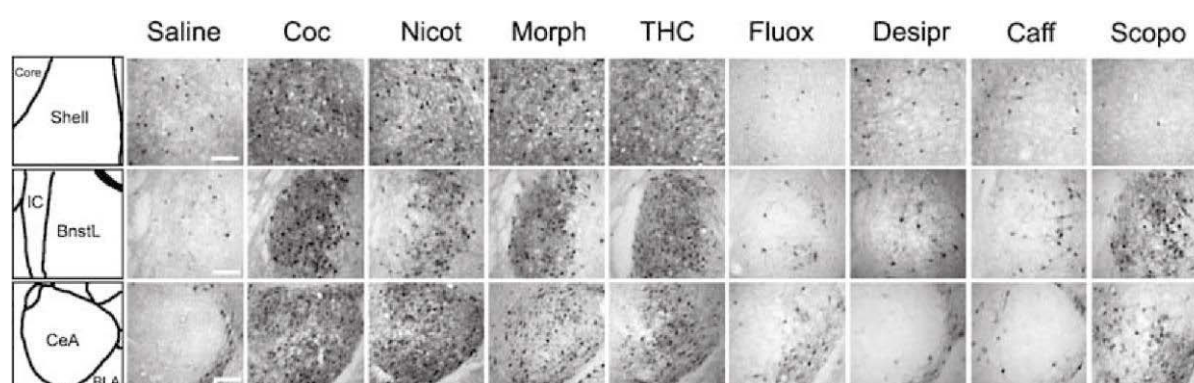


Figure 7 : Activation sélective de ERK dans l'amygdale étendue en réponse aux substances stimulantes addictives ou non addictives.

La forme phosphorylée de ERK1/2 est détectée dans la coquille (shell) du NAcc (panneau du haut), la BNST (Bed nucleus of striata terminalis) (panneau du milieu) et le noyau de l'amygdale centrale (CeA) (panneau du bas) après l'administration de cocaïne, nicotine, morphine, Δ -9 tetra hydro-cannabinol, fluoxétine, désipramine, caféine et scopolamine. (Barre d'échelle, 60 μ m) (Valjent et al., 2004).

3. Activation de ERK par les drogues, convergence des signaux DA et glutamate au sein des MSN

L'intégration des afférences dopaminergiques et glutamatergiques au sein du striatum apparaît comme un mécanisme clé pour la mise en place des adaptations neuronales durables qui sous-tendent l'addiction. Cette convergence est retrouvée dans les neurones striataux au sein desquels l'interaction moléculaire entre ces deux systèmes joue un rôle clé dans les altérations induites par les drogues. Les modalités d'activation de la voie ERK apparaissent comme le reflet de ces interactions positionnant ERK à un point de convergence moléculaire en aval de la stimulation des D1R et NMDAR. En effet, dans les neurones striataux, l'activation de ERK dépend de la stimulation concomitante de ces deux types de récepteurs (Valjent et al., 2000, Jenab et al., 2005, Sun et al., 2007).

a. Mécanismes d'activation de ERK en aval des D1R

Les D1R sont des récepteurs métabotropiques qui sont positivement couplés à l'adénylyl cyclase V via la protéine Gas/olf dans le striatum (Herve et al., 2001). La stimulation de ces récepteurs par la dopamine est associée à une augmentation de la concentration intracellulaire en AMPc (Adénosine Mono Phosphate Cyclique) qui conduit à l'activation de la protéine kinase A (PKA). La fenêtre d'activation de la PKA est contrôlée par des boucles de régulation impliquant l'activation de phosphodiesterases (PDE) exprimées dans le striatum et capables de limiter la production d'AMPc (Menniti et al., 2006). La PKA est une sérine-thréonine kinase qui possède un grand nombre de substrats au travers desquels elle régule de nombreux processus cellulaires tels que la conductance membranaire ou l'expression de gènes. Parmi les cibles de la PKA, on trouve notamment la sous-unité GluN1 des NMDAR (Snyder et al., 1998) ou encore le facteur de transcription CREB (cAMP-responsive element binding protein) dont nous verrons plus tard qu'il joue un rôle clé dans la régulation de gènes importants pour la plasticité striatale. La PKA ne phosphoryle pas directement ERK mais elle est impliquée dans le contrôle de son activation en aval des D1R par l'intermédiaire d'autres protéines cibles. Parmi ces protéines, la phosphatase STEP (Striatal Enriched Protein Phosphatase), dont la phosphorylation par la PKA diminue la liaison à ses substrats, dont ERK (Pulido et al., 1998, Paul et al., 2000).

Par ce mécanisme, l'activation de la PKA conduit indirectement à une augmentation du niveau de phosphorylation de ERK. Une autre protéine, DARPP-32 (**D**opamine and **c**AMP-**r**egulated **p**hosphop**p**rotein) contribue également à amplifier l'activation de ERK en aval de la stimulation des D1R (Valjent et al., 2005). Le résidu Thréonine 34 de DARPP-32 est une cible directe de la PKA, qui, lorsqu'elle est phosphorylée par cette dernière, devient un puissant inhibiteur de la phosphatase PP-1 (**P**rotéine **P**hosphatase **1**) (Greengard et al., 1999). L'inhibition de PP-1 diminue la déphosphorylation de STEP et par conséquent la liaison à ses substrats, favorisant ainsi l'augmentation du niveau de phosphorylation de ERK. Ces deux boucles de signalisation situées en aval de la voie D1/AMPC/PKA convergent vers l'augmentation du niveau de phosphorylation de ERK en aval de la stimulation des D1R (Figure 8).

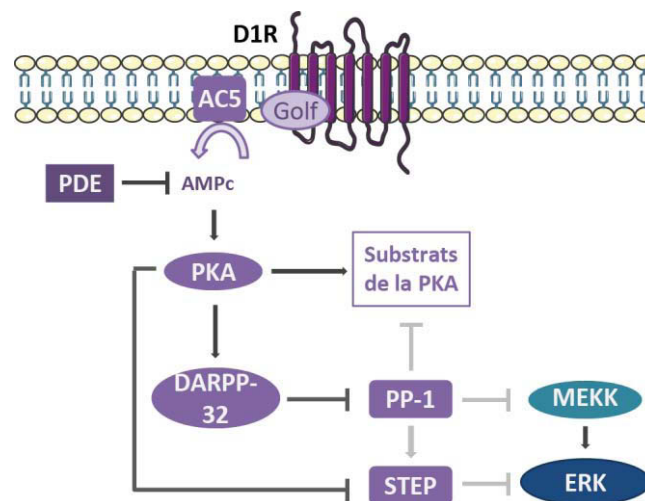


Figure 8 : Schéma de l'activation de ERK en aval de la voie D1/AMPC/PKA/DARPP-32

Les différents acteurs de la voie D1/AMPC/PKA/DARPP-32 sont schématisés dans cette figure. En aval de la stimulation du D1R, la production d'AMPC et l'activation de la PKA conduisent à une inhibition des phosphatases PP-1 et STEP qui convergent vers une facilitation de l'activation de ERK.

Dans les neurones, de nombreux mécanismes cellulaires sont impliqués dans l'activation de ERK au travers de l'augmentation des influx calciques (Finkbeiner and Greengard, 1996). L'activation des NMDAR induite par la fixation du glutamate, entraîne une entrée massive de calcium dans les MSN. Cet influx de calcium conduit à l'activation de la petite protéine G, Ras, par l'intermédiaire de Ras-GRF, un facteur d'échange de nucléotide guanine (GDP en GTP). Ce facteur d'échange est exprimé spécifiquement dans le SNC où il est activé par le complexe Ca^{2+} /Calmoduline (Farnsworth et al., 1995). Une fois activée, la petite protéine G

Ras active à son tour la protéine Raf et déclenche ainsi la cascade d'activation de la voie des MAPK qui se poursuit par l'activation par Raf et finalement ERK (Fasano et al., 2009).

b. ERK, détecteur de coïncidence

Dans les neurones striataux, la stimulation des D1R joue un rôle majeur dans l'activation de ERK par les drogues. En effet, ERK est très majoritairement activé dans les MSN exprimant les D1R et le traitement par un antagoniste D1R abolit cette activation (Valjent et al., 2001, Valjent et al., 2005, Bertran-Gonzalez et al., 2008). La stimulation des NMDAR est également requise pour l'activation de ERK par les drogues (Valjent et al., 2000), positionnant ERK à un point de convergence entre les signaux dopaminergiques et glutamatergiques (**Figure 9**). A la lumière de ces observations, il a été proposé que l'activation de ERK agirait comme un détecteur de coïncidence de l'activation des afférences glutamatergiques et dopaminergiques (Girault et al., 2007). Par ce mécanisme, l'activation de ERK intègre les informations contextuelles portées par les signaux glutamatergiques en provenance du cortex et du thalamus et le signal de la prédiction d'erreur porté par la libération de DA. Si l'injection aiguë de cocaïne augmente significativement la concentration extracellulaire de DA, elle ne modifie pas les niveaux de glutamate ambiant (Zhang et al., 2001). Une étude a récemment montré que la stimulation des D1R potentialise les entrées de calcium au travers des NMDAR par le biais de la phosphorylation de la sous-unité GluN2B de ces récepteurs glutamatergiques. Ce mécanisme fait intervenir une protéine de la famille des SFK (Src Family Kinase) activée en réponse à la cocaïne (Pascoli et al., 2011). Cette voie de signalisation, indépendante de la production d'AMPC est nécessaire pour déclencher l'activation de ERK en réponse à la cocaïne (**Figure 9**). Plus récemment, notre laboratoire a montré que la liaison physique directe (i.e. oligomérisation) entre le D1R et la sous-unité GluN1 des NMDAR était nécessaire à la potentialisation des flux calciques via les GluN2B-NMDAR par la dopamine ainsi qu'à l'activation de ERK par la cocaïne (Cahill et al., 2014a).

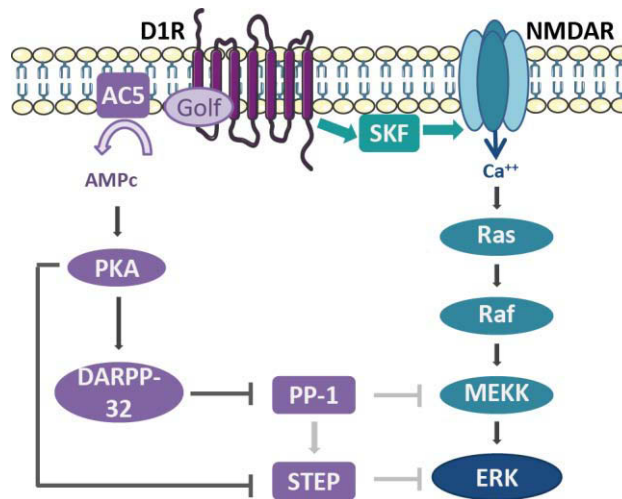


Figure 9 : L'activation de ERK par la cocaïne dans le striatum est un intégrateur des signaux dopaminergiques et glutamatergiques

Représentation schématique des voies de signalisation en aval des D1R et NMDAR convergeant sur la voie ERK en réponse à une injection unique de cocaïne.

4. ERK et les adaptations comportementales induites par les drogues

Au cours des dernières années, de nombreuses études ont contribué à démontrer le rôle de ERK dans les adaptations comportementales induites par les drogues d'abus (Lu et al., 2006, Girault et al., 2007, Pascoli et al., 2014). Ces observations ont été faites en grande partie à l'aide de composés pharmacologiques permettant de bloquer l'activité de la kinase MEK. Parmi ces composés, le SL327, un agent pharmacologique capable de passer la barrière hémato-encéphalique permet l'inhibition de ERK par voie systémique. Si cette approche ne permet pas de contrôler la région dans laquelle ERK est inhibée, elle présente cependant l'intérêt d'être très peu invasive.

a. ERK et sensibilisation locomotrice

L'injection de ce composé à des doses suffisantes pour inhiber la phosphorylation de ERK n'altère ni l'activité locomotrice basale des animaux ni leur réponse aiguë (hyperactivité locomotrice) à une première injection de cocaïne ou d'amphétamine (Valjent et al., 2006b). Ces données suggèrent que la voie ERK est peu ou pas impliquée dans la réponse aiguë aux psychostimulants. A l'inverse, l'activation rapide et transitoire de cette voie dès la première injection de drogue semble jouer un rôle clé dans la mise en place d'adaptations

comportementales à long terme. En effet, l'induction de la sensibilisation locomotrice à la cocaïne ou l'amphétamine est abolie par l'administration du SL327 avant la première injection de drogue (Ferguson et al., 2006, Valjent et al., 2006a). En revanche, l'activation de ERK n'est pas requise pour l'expression de la sensibilisation chez des animaux précédemment sensibilisés et soumis à une injection de cocaïne après une période de sevrage (Valjent et al., 2006a). Ces adaptations comportementales semblent dépendantes de l'activation de l'isoforme ERK-2 puisque l'inactivation génétique de ERK-1 entraîne un effet inverse, à savoir une potentialisation de la sensibilisation locomotrice (Ferguson et al., 2006). De manière intéressante, l'inhibition de ERK dans l'ATV par infusion du PD98059, conduit à une diminution de la sensibilisation locomotrice (Pierce et al., 1999) alors que l'administration aiguë de cocaïne n'entraîne pas d'augmentation de l'activation de ERK dans cette région (Valjent et al., 2004). L'exposition à un stress chronique conduit à une augmentation de la phosphorylation de ERK dans l'ATV qui est associée à un accroissement de la sensibilisation locomotrice à la cocaïne (Yap et al., 2015). L'inhibition de l'activité de ERK localement dans l'ATV, par injection de U0126, avant l'exposition au stress, tend à prévenir cette augmentation de la sensibilisation comportementale induite par la cocaïne (Yap et al., 2015).

b. ERK et préférence de place conditionnée (CPP)

L'induction d'un conditionnement de type CPP, classiquement présentée comme un index de l'effet récompensant des drogues est également dépendant de l'activation de ERK. Au cours de la phase de conditionnement, l'animal reçoit la drogue dans un environnement et le véhicule dans un autre environnement. Lors de la session test, l'animal est libre d'explorer les deux environnements et l'augmentation du temps passé dans le compartiment associé à la drogue reflète la mise en place d'une préférence de place conditionnée. Le blocage de ERK par l'injection systémique de SL327 avant ou après chaque session de conditionnement empêche le développement de la CPP induite par la cocaïne (Valjent et al., 2000), le THC (Valjent et al., 2001) ou la métamphétamine (Salzmann et al., 2003). L'injection locale dans le NAcc d'un autre inhibiteur de MEK, le PD98059, avant ou immédiatement après les sessions de conditionnement, prévient également le développement de la CPP (Gerdjikov et al., 2004). Ces données indiquent que l'activation de ERK est importante pour l'association entre les effets récompensant des drogues et les indices environnementaux qui leur sont

associés. De la même manière que pour la sensibilisation locomotrice, les souris ERK-1 knock-out présentent une préférence de place augmentée pour la cocaïne (Ferguson et al., 2006) et la morphine (Mazzucchelli et al., 2002).

c. ERK, rappel et reconsolidation de la mémoire associée à la drogue

L'activation de ERK semble également impliquée dans le rappel d'une mémoire précédemment associée à la drogue. En effet, l'exposition à un contexte associé à la cocaïne pendant la CPP augmente la phosphorylation de ERK dans le NAcc et une injection locale d'un inhibiteur de MEK, le U0126, immédiatement avant le test bloque l'activation de ERK ainsi que l'expression de la CPP induite par la cocaïne (Miller and Marshall, 2005). ERK semble également impliquée dans la reconsolidation d'une mémoire associée à la drogue puisque l'administration par voie systémique du SL327 bloque l'expression de la CPP lorsqu'il est administré avant l'injection de cocaïne lors d'une session supplémentaire de conditionnement (Valjent et al., 2006a).

d. ERK, symptômes de manque et rechute

La reprise de la consommation de drogue au cours des épisodes de rechute qui suivent une période d'abstinence, est souvent précipitée par l'exposition au contexte (O'Brien, 2005). Dans la période qui suit l'arrêt de la consommation, les individus sont sensibilisés aux indices environnementaux associés à la drogue et la rencontre avec ces stimuli déclenche le désir irrésistible de consommer la substance. Les données issues des modèles animaux indiquent que la sensation de manque ne s'atténue pas au cours de la période de sevrage mais tend plutôt à s'accroître, ce qui a conduit à définir ce phénomène comme une « incubation » du désir de consommer la substance (Grimm et al., 2001, Lu et al., 2004). Après une longue période de sevrage de 30 jours suivant un protocole d'auto-administration, la réexposition au contexte associé à la drogue augmente la phosphorylation de ERK dans l'amygdale (Lu et al., 2005). L'injection locale dans l'amygdale, du U0126, un inhibiteur de MEK, prévient la reprise du comportement d'auto-administration chez le rat (Lu et al., 2005) montrant ainsi l'implication de ERK dans cette réponse conditionnée. La phosphorylation de ERK est également augmentée dans le cortex préfrontal médian suite à la réexposition à des indices précédemment associés à la cocaïne, suggérant que cette structure pourrait jouer un rôle

important dans l'incubation manqué lié à la cocaïne (Koya et al., 2009). L'incubation du désir de consommer une substance est corrélée avec une augmentation des taux de BDNF dans l'ATV, le NAcc et l'amygdale (Grimm et al., 2003, Pu et al., 2006), qui pourrait être associée à l'activité de ERK (Lu et al., 2004, Lu et al., 2005).

5. ERK et la plasticité synaptique induite par les drogues

Les adaptations comportementales à long terme observées en réponse aux drogues reflètent leur impact durable sur le fonctionnement des circuits de récompense au-delà de la cinétique d'augmentation de la DA. L'exposition aux drogues modifie la transmission synaptique au sein de ces régions cérébrales conduisant à la mise en place d'une plasticité synaptique qui contribue à la réorganisation des réseaux neuronaux. Cette plasticité synaptique induite par les drogues semble jouer un rôle important dans les altérations comportementales observées dans l'addiction (Luscher and Malenka, 2011).

Dans le striatum, la voie ERK activée par les drogues joue un rôle central dans les modifications durables de l'activité synaptique des MSN (Pascoli et al., 2014). L'activation de ERK est requise pour la mise en place de la LTP dans les MSN dans un modèle *ex vivo* de tranches striatales (Pascoli et al., 2012). Chez les souris ERK1 KO, l'augmentation de la sensibilisation locomotrice est associée à une augmentation de la LTP induite par des stimulations à haute fréquence dans le NAcc (Ferguson et al., 2006). L'hyperactivation de ERK2 dans ce modèle de perte d'expression de ERK1 suggère que l'augmentation d'activité de ERK2 accentue la sensibilité aux drogues. Dans le NAcc, l'exposition à la cocaïne conduit à une occlusion de la LTP induite par des stimulations à haute fréquence, spécifiquement dans les D1-MSN (Pascoli et al., 2012). L'inhibition de l'activité de ERK dans le NAcc qui est associée à une diminution de la sensibilisation locomotrice conduit également à une perte de cette occlusion de la LTP par la cocaïne (Pascoli et al., 2012). Cette étude montre également que l'activation de ERK au cours des minutes suivant une première injection de cocaïne est requise pour le renforcement de l'efficacité synaptique détectée 5 jours après l'injection. De manière intéressante, l'application d'un protocole de type LFS (**L**ow **F**requency **S**timulation) par stimulation optogénétique du NAcc chez des animaux exposés à la cocaïne, conduit à une restauration de la transmission synaptique des MSN et entraîne une perte de la sensibilisation locomotrice induite par cette drogue. Cette étude permet d'établir un lien causal entre

l'activation de la voie ERK, la potentialisation des synapses glutamatergiques et les réponses comportementales induites par la cocaïne (Pascoli et al., 2012).

La régulation du trafic des récepteurs AMPA est un mécanisme cellulaire central dans la mise en place de la plasticité synaptique. L'activation de ERK conduit à une augmentation rapide de l'expression des récepteurs AMPA de surface qui est requise pour l'expression de la LTP (Zhu et al., 2002). De la même manière, l'inhibition de ERK bloque l'insertion des récepteurs AMPA au cours de la mise en place de la LTP dans l'hippocampe (Patterson et al., 2010). Dans le NAcc, l'augmentation de l'activité de ERK est corrélée avec l'expression des AMPA de surface au cours d'un sevrage suite à une exposition chronique à la cocaïne (Boudreau et al., 2007).

Au cours des deux paragraphes suivants, je détaillerai le rôle spécifique de certains substrats de ERK dans les modèles d'adaptations à long terme induites par les drogues d'abus.

6. Substrats cytoplasmiques de ERK

Suite à son activation, ERK phosphoryle de nombreux substrats dans différents compartiments cellulaires, dont le noyau, le cytoplasme et la membrane plasmique (Grewal et al., 1999, Raman et al., 2007). La grande variété des cibles de ERK lui confère la capacité de réguler de multiples fonctions cellulaires et de moduler la plasticité neuronale au travers de nombreux mécanismes. Il est proposé que la voie ERK module la plasticité à court terme au travers de l'activation de cibles cytoplasmiques et membranaires alors que la phosphorylation de facteurs de transcription et de protéines nucléaires serait impliquée dans la régulation de la plasticité à long terme. Suite à son activation par les drogues, ERK, est détectée dans le soma et les dendrites et s'accumule rapidement dans le noyau (Valjent et al., 2000) (**Figure 10**). La présence de la forme active de la protéine dans ces différents compartiments cellulaires suggère fortement que ERK influence les réponses aux drogues en interagissant avec des substrats cytoplasmiques et nucléaires. Ce sont cependant les cibles nucléaires de ERK qui ont été les mieux décrites en réponse aux drogues et la voie ERK apparaît comme un acteur important pour les régulations géniques. Bien que moins décrites dans le contexte de l'addiction, les cibles cytoplasmiques de ERK sont également importantes pour la plasticité synaptique notamment dans l'hippocampe (Kelleher et al., 2004a). Ces mécanismes cytoplasmiques et indépendants de la transcription pourraient rendre compte du rôle de ERK

dans des régulations rapides de la plasticité synaptique et des réponses comportementales conditionnées. Dans cette section, je présenterai différents substrats cytoplasmiques de ERK décrits dans d'autres modèles de plasticité et dont il est envisageable qu'ils soient impliqués dans les adaptations neuronales induites par les drogues.

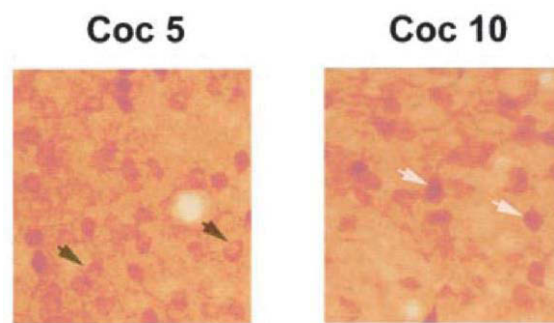


Figure 10 : Accumulation nucléaire de la forme phosphorylée de ERK en réponse à une injection aiguë de cocaïne

La forme phosphorylée de ERK est ici détectée par immunocytochimie dans le striatum de souris 5 min (Coc 5) ou 10 min (Coc 10) après une injection de cocaïne à 20 mg/kg. 5 min après l'injection, la majorité de neurones présentent un marquage majoritairement cytoplasmique (indiqué par les flèches noires) alors qu'à 10 min, la majorité des cellules présente un marquage nucléaire (indiqué par les flèches blanches)

a. Les protéines du cytosquelette

Parmi les cibles cytoplasmiques de ERK se trouvent des composants du cytosquelette tels que les protéines MAP (Microtubules Associated Protein), les neurofilaments ou encore les protéines Tau (Ray and Sturgill, 1988, Valjent et al., 2001). Dans les neurones, la régulation de la dynamique du cytosquelette est un processus important pour les changements de morphologie dendritique qui sous-tendent la plasticité des réseaux neuronaux. De telles adaptations structurelles sont observées en réponse aux drogues et pourraient rendre compte des altérations fonctionnelles qu'elles induisent dans les circuits de récompense (Russo et al., 2010). Dans le striatum, la cocaïne induit des changements de la morphologie et de la densité des épines dendritiques des MSN qui sont associés à une modification de l'efficacité synaptique (Robinson and Kolb, 1999, Heck et al., 2014) (Figure 11). Ces changements structurels au sein des MSN dépendent de l'activation de la voie ERK mais également de la stimulation des D1R et NMDAR (Ren et al., 2010). L'intégration des influx dopaminergiques et glutamatergiques au niveau des MSN apparaît comme un élément clé pour les adaptations morphologiques induites par les drogues (Yagishita et al., 2014). Si l'activation de la voie

ERK semble importante, les substrats cytoplasmiques impliqués dans ces remodelages structuraux, directement ou indirectement, en aval de ERK restent peu connus. Des données issues d'autres modèles permettent d'envisager certains substrats et mécanismes d'actions potentiels. La spinophiline, une protéine phosphatase impliquée dans le remodelage dendritique est ciblée par ERK et sa phosphorylation est associée à une augmentation du nombre de filopodes (Futter et al., 2005). Dans le striatum, la spinophiline est impliquée dans la plasticité de la synapse cortico-striatale induite par la dopamine (Allen et al., 2006). ERK phosphoryle également des membres du complexe WR2 (WAVE2 Regulatory Complex) impliqué dans l'assemblage du cytosquelette d'actine (Mendoza et al., 2011). Ces protéines, importantes pour la régulation de la morphologie dendritique dans des neurones d'hippocampe (Ito et al., 2010), représentent des partenaires potentiels de ERK dans la régulation du cytosquelette au cours de la spinogénèse induite par les drogues.

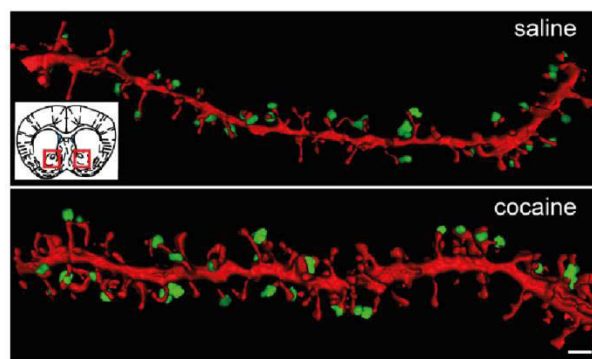


Figure 11 : Changement de la morphologie des épines dendritiques en réponse à des injections répétées de cocaïne

L'arbre dendritique est ici analysé dans le striatum de souris knock-in Venus-VGLUT1, chez qui le transporteur au glutamate VGLUT1 est fusionné à une cassette Venus, permettant la visualisation des éléments pré-synaptiques glutamatergiques (vert). Les dendrites (rouge) marquées à l'aide d'un marqueur lipophile des membranes (Dyl) sont ici visualisées dans une reconstruction en 3 dimensions. Le couplage de ces deux marquages permet de visualiser les synapses glutamatergiques formées entre l'arbre dendritique du MSN(rouge) et le bouton pré-synaptique glutamatergique. Un traitement chronique à la cocaïne dans un protocole de sensibilisation locomotrice (6j, 20 mg/kg) augmente la densité d'épines dendritiques dans les MSN, associée à la formation de nouvelles connections glutamatergiques.

b. Protéines membranaires

L'activation de ERK participe également à la régulation de l'efficacité de la transmission synaptique au travers de la phosphorylation de cibles membranaires telles que des récepteurs

Tyrosine Kinase, des récepteurs ionotropiques ou encore des récepteurs couplés aux protéines G (Grewal et al., 1999). ERK est également impliquée dans la régulation de l'excitabilité des neurones pyramidaux de l'hippocampe au travers de la phosphorylation de certains résidus des canaux Kv4.2 (Adams et al., 2000, Schrader et al., 2006). ERK semble également impliquée dans la plasticité synaptique au travers de la régulation du trafic des récepteurs glutamatergiques de type AMPA (Alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole propionic acid receptor) et de leur recrutement à la synapse au cours de l'établissement de la LTP (Long-Term Potentiation) (Zhu et al., 2002, Qin et al., 2005, Patterson et al., 2010). ERK participe également à la régulation de l'adressage membranaire des AMPAR au travers de la phosphodiesterase 4 (Song and Tang, 2014). La voie ERK semble également contribuer à la régulation de l'efficacité synaptique au travers de cibles présynaptiques. La phosphorylation de la synapsine I en réponse à l'application de BDNF est notamment dépendante de l'activation de la voie ERK et contribue à la facilitation de la libération de glutamate par l'élément présynaptique (Jovanovic et al., 2000). La phosphorylation de la synapsine I par ERK tend à diminuer sa liaison à l'actine et facilite ainsi la mobilité des vésicules dans la zone active ainsi que leur probabilité de fusion à la membrane (Jovanovic et al., 1996). L'expression de la synapsine 1 est spécifiquement augmentée dans l'hippocampe chez le rat en réponse à un protocole d'induction de la LTP et pourrait être impliquée dans la modulation de la libération du glutamate au cours de la mise en place de la plasticité à long terme (Hicks et al., 1997).

c. Protéines cytoplasmiques

Dans le cytoplasme, ERK est également impliquée dans les mécanismes de régulation de la traduction des ARNm. L'initiation de la traduction qui constitue l'étape limitante de la synthèse protéique est la cible d'un grand nombre de mécanismes de régulation. Au cours de cette étape d'initiation, le recrutement des ribosomes au niveau des ARNm peut se faire par deux mécanismes distincts. Les ribosomes peuvent être recrutés au niveau de séquences de type IRES (Internal Ribosomal Entries Sequences) présentes dans les messagers, selon un processus indépendant de la coiffe. Le second mécanisme, dépendant de la coiffe, consiste en un recrutement des ribosomes au niveau de la coiffe située dans la région 5' des ARNm et implique le facteur d'initiation de la traduction eIF4E (Costa-Mattioli et al., 2009). La voie ERK participe à la régulation de la synthèse protéique au travers de la phosphorylation de

cibles impliquées directement ou non dans l'initiation de la traduction. ERK participe notamment à l'activation par phosphorylation du complexe mTORC1 (**M**ammalian **T**arget **O**f **R**apamycin **C**omplex 1). Il peut agir sur ce complexe soit en activant, par phosphorylation, la protéine PDK1/2 (3-**P**hosphoinositide-**D**ependant protéine **K**inase 1/2), soit en phosphorylant et inactivant TSC2 (**T**uberous **S**clerosis **C**omplex 2) (Frodin et al., 2000, Ma et al., 2005). L'inactivation du complexe TSC1/TSC2 conduit à l'inactivation de Rheb et de mTORC1 aboutissant à une augmentation de la phosphorylation de 4E-BP qui entraîne la libération de eIF4E (Gingras et al., 1999). La libération d'eIF4E permet sa liaison à eIF4G et eIF4A pour former le complexe actif eIF4F impliqué dans l'initiation de la traduction. Il est proposé que les voies ERK et mTORC agissent en synergie dans la régulation de la traduction via eIF4E. ERK régule également la traduction au travers de l'activation de la kinase Mnk1 (**M**itogen-activated protéine kinase-interacting **k**inase**1**) qui phosphoryle eIF4E (Knauf et al., 2001, Ueda et al., 2004a). Dans l'hippocampe, la stimulation des NMDAR conduit à une augmentation du niveau de phosphorylation de Mnk1 et eIF4E qui dépend de l'activation de la PKA et de la voie ERK (Banko et al., 2004). Dans un protocole d'induction d'une LTP au niveau de la voie perforante de l'hippocampe, l'activation de la voie ERK conduit à une augmentation de la phosphorylation de Mnk1 qui, suite à son activation, phosphoryle à son tour eIF4E (Panja et al., 2009). Dans ce modèle, l'activation de la voie ERK/Mnk1/eIF4E est requise pour l'augmentation d'expression de la protéine Arc en réponse à l'induction de la LTP. Dans l'hippocampe, la régulation de la traduction par la voie ERK est cruciale pour l'établissement de la LTP et la consolidation de la mémoire (Kelleher et al., 2004a, Kelleher et al., 2004b). Dans les MSN, aucune cible cytoplasmique directe de ERK n'a été démontrée comme impliquée dans les altérations neuronales induites par les drogues.

7. Substrats nucléaires de ERK impliqués dans les adaptations neuronales induites par les drogues d'abus

a. ERK et les régulations géniques induites par les drogues

Dans les neurones, la voie ERK participe à la transmission du signal depuis la membrane jusqu'au noyau et contribue ainsi à un couplage efficace entre l'activité synaptique et la transcription dépendante de l'activité. Au travers de la phosphorylation de substrats

nucléaires, ERK régule l'activation rapide et spécifique de la transcription de gènes impliqués dans la mise en place d'une réponse neuronale appropriée. Dans des conditions basales, ERK est présent dans le cytoplasme sous sa forme non phosphorylée. La kinase de ERK, MEK, contient une signal d'export nucléaire (NES, **N**uclear **E**xport **S**ignal) et pourrait être responsable de la rétention cytoplasmique de la forme non phosphorylée de ERK. En effet, MEK dans son état inactif, non phosphorylé, est localisée dans le cytoplasme et possède une forte affinité pour son substrat ERK (Fukuda et al., 1997). L'activation de ERK par phosphorylation entraîne un changement de sa conformation et conduit à sa dissociation de MEK, nécessaire à sa translocation nucléaire (Wolf et al., 2001). En réponse à une stimulation glutamatergique, la translocation nucléaire de ERK dépend de son recrutement à des complexes protéiques contenant des marqueurs de l'endocytose clathrine-dépendante qui sont issus de l'endocytose des AMPAR (Trifilieff et al., 2009).

L'exposition aux drogues induit un programme transcriptionnel complexe au sein des neurones striataux. De nombreuses formes de plasticité neuronales impliquées dans l'apprentissage et la mémoire sont dépendantes de l'expression génique (Kandel, 2001). Dans les MSN, les modifications transcriptionnelles dépendent d'une synergie entre les mécanismes cellulaires en aval des D1R et des NMDAR (Konradi et al., 1996). En aval de ces signaux extracellulaires, la voie ERK semble jouer un rôle important dans la mise en place de ces régulations géniques induites par les drogues (Valjent et al., 2000, Ferguson and Robinson, 2004, Bami-Cherrier et al., 2005, Valjent et al., 2005, Piechota et al., 2010b). Suite à son activation par les drogues, ERK module de nombreuses réponses transcriptionnelles au travers de ses substrats nucléaires. ERK régule notamment l'expression de gènes immédiats précoces qui sont fortement impliqués dans la mise en place des réponses neuronales suite à une activité synaptique. Les gènes immédiats précoces, ou IEG (**I**mmEDIATE **E**arly **G**enes) sont définis comme des gènes rapidement induits en réponse à une stimulation synaptique intense ou par des signaux chimiques tels que des neurotransmetteurs ou des facteurs de croissance. L'une des principales caractéristiques commune à ces gènes est le fait que l'induction rapide de leurs ARNm ne dépend pas nécessairement de la synthèse de nouvelles protéines (Sheng and Greenberg, 1990, Flavell and Greenberg, 2008). Un grand nombre de ces IEG, encodent des facteurs de transcription impliqués dans l'induction d'un programme génétique au travers de la transcription d'une seconde vague de gènes importants pour la mise en place d'adaptations cellulaires durables. Parmi ces IEG encodant des facteurs de transcription, on trouve notamment, c-fos, zif268, Jun-B ou encore FosB. Cependant, certains de ces IEG, tels

que *arc*, *homer1a* ou *narp* encodent des protéines qui ne sont pas des facteurs de transcription et interagissent directement avec des protéines préexistantes pour modifier la réponse neuronale.

Les drogues modifient l'expression de nombreux IEG dans différentes régions du système mésocorticolimbique. L'injection aigüe de cocaïne augmente notamment l'expression du gène *arc/arg3.1* encodant pour la protéine Arc (**A**ctivity-**R**egulated and **C**ytoskeleton associated protéine) qui fait l'objet du chapitre 3 de ce manuscrit (Fosnaugh et al., 1995). L'expression du gène *zif268* (**Z**inc **F**inger transcription factor 268 ou egr-1 **e**arly **g**rowth **r**esponse protéine 1) est augmentée dans le striatum en réponse à l'injection d'amphétamine ou de cocaïne (Moratalla et al., 1992). L'induction de ce gène par la cocaïne dépend de l'activation de la voie ERK (Radwanska et al., 2005) et s'avère essentielle pour les réponses à la cocaïne. En effet, son invalidation dans un modèle génétique *zif268* knock-out conduit à des altérations de la sensibilisation locomotrice ainsi que la CPP (Valjent et al., 2006b). La régulation des gènes encodant les facteurs de transcription de la famille Fos a été largement étudiée en réponse aux drogues (Graybiel et al., 1990, Moratalla et al., 1993). Cette famille comprend les facteurs de transcription *c-fos*, *FosB*, *FosB* et enfin *Fra1* (**F**os-**r**elated **a**ntigen **1**) et *Fra2* qui forment des dimères avec les protéines de la famille Jun pour constituer un complexe de facteurs de transcription nommé AP-1. Les gènes *c-fos* et *fosB* sont notamment induits dans le striatum dorsal et ventral en réponse à une injection aigüe de cocaïne (Graybiel et al., 1990, Moratalla et al., 1992). Si ces deux gènes sont fortement induits par une injection aigüe, l'administration chronique de cocaïne induit une tolérance qui conduit à une diminution de l'amplitude de leur induction. Cependant, la protéine Δ FosB, une forme tronquée de la protéine FosB résultant d'un épissage alternatif tend, elle, à s'accumuler au cours d'un traitement chronique du fait notamment de sa stabilité (Chen et al., 2000, McClung et al., 2004, Larson et al., 2010). Δ FosB intervient dans la régulation de nombreux gènes tels que NF κ B ou Cdk5 qui sont tous deux augmentés par un traitement chronique à la cocaïne (Chen et al., 2000, Bibb et al., 2001, McClung and Nestler, 2003). La voie ERK régule l'expression de nombreux IEG induits par les drogues dans différentes régions des circuits de récompense (Valjent et al., 2000, Zhang et al., 2001, Bami-Cherrier et al., 2005, Jenab et al., 2005, Mattson et al., 2005, Radwanska et al., 2005, Radwanska et al., 2006). Les protéines ERK nucléaires influencent les mécanismes transcriptionnels en régulant l'activité de facteurs de transcription de façon directe ou indirecte. L'activation de ERK module également la structure de la chromatine au travers de la phosphorylation indirecte de certaines histones. Les substrats nucléaires de ERK sont

nombreux et ceux qui sont abordés dans cette partie ont été sélectionnés au regard de leur implication dans les régulations géniques induites par les drogues.

b. Régulations transcriptionnelles via la kinase MSK-1

MSK-1 appartient à la famille des protéines MSK (Mitogen and Stress activated Kinase) qui sont activées par phosphorylation par les MAPK/p38 et les ERK (Deak et al., 1998). MSK-1 est enrichie dans le striatum (Heffron and Mandell, 2005). Suite à son activation par phosphorylation, MSK-1 catalyse, entre autres, la phosphorylation de la protéine CREB (Arthur and Cohen, 2000). CREB appartient à la famille des facteurs de transcription à leucine-zipper qui se lie à l'ADN via les séquences consensus CRE (cAMP Responsive Element). La phosphorylation de CREB sur son résidu Ser¹³³ induit son activité transcriptionnelle au niveau des promoteurs porteurs de sites CRE. L'activation de CREB conduit au recrutement de co-activateurs transcriptionnels tels que CBP (CREB Binding Protéine), p300 ou encore CRCT1 qui sont requis pour l'activation de la transcription (Kwok et al., 1994, Parker et al., 1996). La protéine CBP contribue à l'initiation de la transcription via sa liaison à la RNA Pol-II (ARN Polymerase II) qui favorise son recrutement au niveau du promoteur (Kee et al., 1996). La CBP favorise également l'initiation de la transcription au travers de son activité acétyl-transférase qui est impliquée dans la décompaction locale de la chromatine requise pour le recrutement de la machinerie transcriptionnelle (Mayr and Montminy, 2001) (**Figure 12**). CREB n'est pas uniquement ciblé par ERK et de nombreuses protéines kinases dépendantes de l'AMPc (PKA) ou du calcium et de la calmoduline (CAMK II ou IV, Calcium calmodulin-dépendant kinase de type II ou IV) peuvent également phosphoryler le résidu Ser¹³³ de CREB.

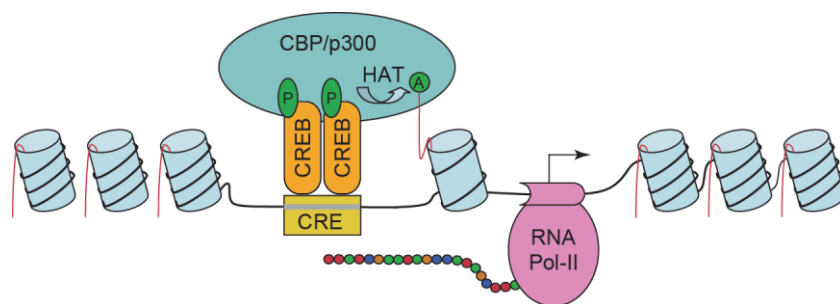


Figure 12 : Représentation schématique de l'activation transcriptionnelle dépendante de CREB

La phosphorylation des dimères de CREB sur le résidu Ser¹³³ active une cascade d'évènements qui implique le recrutement de protéines associées telles que le co-activateur transcriptionnel, CBP/p300. Ces évènements aboutissent à l'assemblage du complexe transcriptionnel. Ce complexe participe au remodelage de la chromatine au travers du recrutement de protéines HAT (Histones Acetyl Transferase) telles que CBP mais aussi d'autres protéines impliquées dans la régulation de la liaison entre la chromatine et les histones (cylindres bleus). Les traits rouges représentent les queues N-terminales des histones qui peuvent subir des modifications post-traductionnelles telles que l'acétylation. L'ensemble de ces mécanismes favorisent la synthèse d'ARN par la RNA Pol-II. (Carlezon et al., 2005).

Dans les neurones striataux, les niveaux de phosphorylation de MSK-1 (Thr⁵⁸¹) et de CREB (Ser¹³³) sont augmentés en réponse à une injection de cocaïne (Brami-Cherrier et al., 2005). L'activation de ces deux protéines dépend de ERK puisque chacune d'elle est abolie en présence du SL327, un inhibiteur de MEK. L'activation de CREB par la cocaïne n'est pas retrouvée chez des souris *msk-1* KO et semble donc dépendre de l'activation de MSK-1 en aval de ERK. (Brami-Cherrier et al., 2005). Bien que la phosphorylation de CREB sur le résidu Ser¹³³ soit la cible de nombreuses kinases telles que RSK1/2, CAMK IV ou PKA, son activation dans le striatum, en réponse à la cocaïne dépend majoritairement de MSK-1 (Brami-Cherrier et al., 2005, Mattson et al., 2005). Comme nous l'avons vu, l'activation de CREB conduit à son association à des protéines co-activatrices telles que la CBP, importantes pour le recrutement de la machinerie transcriptionnelle et l'induction de gènes. Le facteur de transcription CREB est régulé par de nombreuses drogues et participe à la régulation transcriptionnelle de nombreux gènes importants pour la mise en place de la plasticité induite par les drogues (McClung and Nestler, 2008). L'abolition génétique de *msk-1* est associée à des modifications du programme génique induit par la cocaïne et notamment à une perte de l'induction des gènes immédiats précoces c-Fos et dynorphine dont l'expression est normalement augmentée en réponse à cette drogue. L'induction par la cocaïne du gène immédiat précoce *zif268* est en revanche préservée chez ces animaux (Brami-Cherrier et al., 2005). La protéine MSK-1 est également impliquée dans la phosphorylation de résidus spécifiques des histones H1, H2B, H3 et d'une protéine non-histone liée aux nucléosomes, HMG-14 (High Mobility Group-14) (Thomson et al., 1999a). De tels évènements jouent un rôle important dans le remodelage de la chromatine qui contribue à l'initiation de la transcription (Thomson et al., 1999b). Dans les neurones striataux, l'activation de MSK-1 en aval de ERK catalyse la phosphorylation des histones H3 sur leur résidu Ser¹⁰ (Brami-Cherrier, 2005 ; 2007 ; 2009). Une autre protéine activée en aval de ERK, la kinase RSK-2 (Ribosomal S6 Kinase 2) présente des propriétés similaires à celles de MSK-1. En effet, RSK-

2 est également impliquée dans la phosphorylation de CREB (Xing et al., 1996) ainsi que des résidus Ser¹⁰ des histones H3 (Sassone-Corsi et al., 1999, Crosio et al., 2000). D'autres kinases sont impliquées dans la phosphorylation des histones H3 sur leur sérine 10, telles que la PKC (**P**rotein **K**inase **C**), IKK α (IkB Kinase α) ou encore AKT1.

L'activation de MSK-1 en aval de ERK est également impliquée dans l'augmentation du niveau de phosphorylation des histones H3 (Ser¹⁰) induit en réponse à une injection de cocaïne (Brami-Cherrier et al., 2005). Les modifications post-traductionnelles des histones contribuent à la décompaction de l'ADN requise pour le recrutement de la machinerie transcriptionnelle. L'augmentation du niveau de phosphorylation des histones H3 est associée à une activation de la transcription (Brami-Cherrier et al., 2009). Chez les souris *msk-1 KO*, la perte de phosphorylation des histones H3 en réponse à l'injection de cocaïne est associée à une perte de l'induction de gènes immédiats précoces tels que c-Fos et la dynorphine (Brami-Cherrier et al., 2005). Ces réponses moléculaires sont associées à des modifications des réponses comportementales induites par la cocaïne. Les souris *msk-1 KO* présentent une altération de la sensibilisation locomotrice alors que la préférence de place conditionnée est augmentée chez ces animaux. Ces données sont en accord avec l'implication de CREB et de la dynorphine dans les effets aversifs des drogues (Carlezon et al., 2005).

c. Regulations transcriptionnelles via Elk-1

Dans le noyau, ERK phosphoryle la protéine Elk-1. Cette protéine est un facteur de transcription à domaine Ets qui appartient à la famille des TCF (**T**ernary **C**omplex **F**actor) (Hipskind et al., 1991). Les facteurs de transcription de type TCF s'associent à des dimères de protéines SRF (**S**erum **R**esponsive **F**actor) pour former un complexe protéique qui se lie à l'ADN au niveau de séquences consensus de type SRE (**S**erum **R**esponsive **E**lement) (**Figure 13**) (Treisman, 1996). La fixation à haute affinité de Elk-1 au niveau des sites SRE dépend de sa liaison aux protéines SRF. Elk-1 est directement phosphorylé par ERK sur les sérines 383 et 389 (Gille et al., 1995). La phosphorylation de Elk-1 au niveau de ces deux résidus est déterminante pour l'activation transcriptionnelle via les sites SRE présents dans les promoteurs de nombreux IEG tels que *c-fos*, *zif268* ou *junB* (Janknecht et al., 1993, Treisman, 1995).

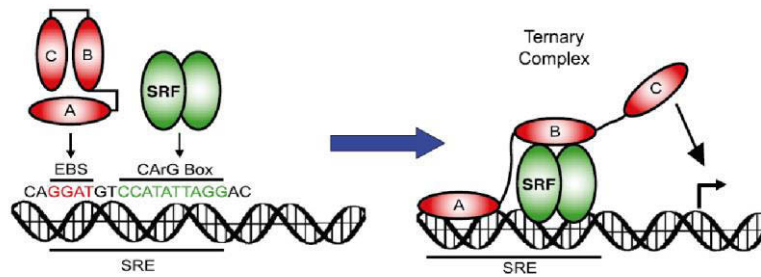


Figure 13 : Représentation schématique de la formation du complexe TCF

Le dimère SRF interagit avec la séquence consensus de type SRE ou *CArG box* (CC[A/T]₆GG). Le domaine A (domaine Ets) du TCF se lie à la séquence consensus de type EBS. Les séquences EBS et CArG représentées ici correspondent au site SRE du promoteur de *c-fos*. Le domaine B du TCF contient l'interface impliquée dans l'interaction avec le SRF et le domaine C, les résidus Serine ciblés par les protéines ERK activées. (Buchwalter et al., 2004)

L'activation de Elk-1 en aval de ERK est également un événement important pour les réponses transcriptionnelles induites par les drogues. Dans les MSN, le facteur de transcription Elk-1 est phosphorylé par ERK en réponse à une injection aigue de cocaïne ou d'amphétamine (Valjent et al., 2000, Choe et al., 2002). La phosphorylation de Elk-1, par ERK, sur ses résidus Ser^{383/389} conduit à sa translocation nucléaire (Lavaur et al., 2007). L'utilisation d'un peptide interférant capable d'inhiber sélectivement la phosphorylation de Elk-1 a révélé que son activation est essentielle pour les réponses moléculaires ainsi que le développement de la sensibilisation locomotrice et de la CPP induites par la cocaïne (Besnard et al., 2011). De manière intéressante, l'inhibition de Elk-1 conduit à une diminution de la phosphorylation des histones H3 en réponse à la cocaïne sans altérer la phosphorylation de MSK-1. Ces données indiquent que Elk-1, sous sa forme active, pourrait agir au sein du noyau, comme une protéine d'échafaudage pour le recrutement de MSK-1 au niveau de l'ADN (Zhang et al., 2001). Le facteur de transcription Elk-1 exerce une régulation sur la transcription d'IEG tels que *junB*, *zif268* ou *Nur77* et son inhibition entraîne une diminution partielle de l'induction par la cocaïne des gènes *c-fos*, *zif268* ou encore *arc* dans le striatum. Ces changements d'expression génique sont associés à une diminution de la sensibilisation locomotrice ainsi que de la préférence de place conditionnée (Besnard et al., 2011).

d. Régulations épigénétiques induites par les drogues

La régulation de la transcription ne repose pas uniquement sur l'activation des voies de signalisation et de facteurs de transcription mais dépend également de modifications de la

structure de l'ADN. Dans le noyau des cellules, l'ADN est étroitement compacté et s'associe avec de nombreuses protéines pour former un complexe hautement organisé appelé chromatine. Le niveau de compaction de la chromatine est déterminant pour l'initiation de la transcription puisqu'il conditionne l'accessibilité de l'ADN aux protéines chargées de sa transcription. A l'état basal, la chromatine hautement compactée est inaccessible à la machinerie transcriptionnelle alors que sa décompaction favorise sa fixation à l'ADN. Cet état de compaction est notamment contrôlé par les histones, des protéines basiques intimement liées à l'ADN qui jouent un rôle central dans l'organisation de la chromatine (Li et al., 2007). Les changements de conformation de la chromatine dépendent notamment de modifications post-traductionnelles des histones qui vont moduler leur niveau d'interaction à l'ADN. Les histones sont soumises à diverses modifications post-traductionnelles telles que la phosphorylation, l'acétylation ou encore la méthylation et l'ubiquitination qui vont influencer la transcription de différentes manières (Bannister and Kouzarides, 2011). L'épigénétique fait référence à ces mécanismes qui modulent l'expression des gènes en amont de l'information portée par la séquence du gène. Ces mécanismes moléculaires sont affectés par les drogues et apparaissent comme des processus importants pour la mise en place d'adaptations neuronales durables observées dans l'addiction (Walker et al., 2015)

Les modifications post-traductionnelles des histones induites par les drogues sont responsables de nombreuses altérations transcriptionnelles (Renthall and Nestler, 2008, Maze et al., 2010). L'induction de *c-fos* et *fosB* par la cocaïne est notamment associée à une augmentation de l'acétylation des histones H4 au niveau de leur promoteur (Kumar et al., 2005). Les histones déacétylases (HDAC) sont les enzymes impliquées dans la déacétylation des histones qui promeut la compaction de la chromatine et, par conséquent, est généralement associée à une inhibition de la transcription. L'inhibition de ces enzymes augmente l'effet locomoteur et récompensant de la cocaïne alors que leur surexpression diminue la CPP (Kumar et al., 2005, Renthall et al., 2007). La voie ERK est impliquée dans ces mécanismes de remodelage de la chromatine via notamment la kinase MSK-1. Nous avons vu précédemment que la voie ERK contrôle la phosphorylation des histones H3 induite par la cocaïne (Brami-Cherrier et al., 2005). La phosphorylation des histones favorise la transcription en participant à la décompaction de la chromatine. En effet, chez les souris *msk-1* ko, la perte de phosphorylation des histones est associée à une perte de l'induction des IEG *c-fos* et *dynorphine* (Brami-Cherrier et al., 2005, Jordi et al., 2013) Dans le striatum, les réponses épigénétiques induites par la cocaïne sont spécifiques du type cellulaire et dépendent de la

durée de l'exposition à la drogue. (Jordi et al., 2013) Bien que certains résidus soient communément altérés, le patron des modifications post-traductionnelles des histones se révèle différent au sein des D1-MSN et les D2-MSN. Les réponses observées dans ces populations sont également affectées différemment par un traitement aigu ou chronique. Ces données démontrent la spécificité de ces réponses épigénétiques et suggèrent qu'elles jouent un rôle important dans la mise en place d'un programme transcriptionnel spécifique. (Jordi et al., 2013)

L'activation de la voie ERK par les drogues joue un rôle essentiel dans la mise en place d'un programme transcriptionnel complexe au sein des MSN. Ces régulations géniques sont centrales pour les réponses moléculaires et comportementales induites par les drogues. Les gènes induits au cours de ces régulations sont impliqués dans de nombreuses fonctions cellulaires importantes pour la mise en place d'adaptations neuronales durables. Parmi, ces gènes, nous avons évoqué le gène *arc*, induit dans le cortex et le striatum en réponse à la cocaïne. Les modalités de régulation de cet IEG ainsi que ses fonctions dans la plasticité neuronale et les adaptations comportementales à long terme sont abordées de manière détaillée dans le chapitre suivant.

Chapitre III. Arc

La protéine Arc a été décrite pour la première fois en 1995, simultanément, mais de façon indépendante par les groupes de Paul Worley à l'Université John Hopkins et Dietmar Khul au Max Planck Institute. Les travaux menés par le groupe du Pr. Worley visaient à identifier de nouveaux IEG impliqués dans la plasticité synaptique et la mémoire. Dans le système nerveux central, ces gènes rapidement induits par l'activité synaptique jouent un rôle important dans la mise en place des adaptations cellulaires à long terme qui sous-tendent la plasticité neuronale (Sheng and Greenberg, 1990, Flavell and Greenberg, 2008). Les IEG ont été initialement définis comme des gènes encodant des protéines qui contrôlent l'expression d'une seconde vague de gènes, dit gènes tardifs. (Sheng and Greenberg, 1990). Les produits de ces gènes tardifs étant plus spécifiquement impliqués dans des fonctions cellulaires importantes pour l'établissement de la plasticité neuronale. Ainsi, la plupart des IEG décrits à cette époque encodent des facteurs de transcription et très peu de protéines issues de ces gènes avaient une fonction directe dans la plasticité synaptique. Ce constat a conduit à rechercher de nouveaux IEG dits « IEG effecteurs » qui encoderaient des protéines capables d'interagir avec des substrats protéiques préexistants pour réguler directement l'efficacité synaptique. Par une technique de clonage soustractif, l'équipe du Pr. Worley entreprit d'isoler les ARNm induits dans l'hippocampe de rat en réponse à l'application de chocs électroconvulsifs. En parallèle de facteurs de transcription, les auteurs ont identifié de nombreux IEG effecteurs codant pour des facteurs de croissance (BDNF), des molécules impliquées dans la transduction du signal (Homer 1a, Rheb), des enzymes métaboliques (Cox-2) ou encore des protéines de surface (Narp) (Barde, 1990, Yamagata et al., 1994, Tsui et al., 1996, Brakeman et al., 1997, Guzowski, 2002). Parmi ces différents IEG, ils ont identifié le gène *arc* encodant une protéine caractérisée par une forte homologie avec les spectrines, capable de s'associer au cytosquelette et enrichie dans les dendrites (Lyford et al., 1995). En parallèle de ce travail, le groupe de Dietmar Khul, a isolé Arc dans l'hippocampe sous le nom de Arg3.1 (Link et al., 1995).

Dès cette première caractérisation, ce gène rapidement induit par l'activité dont la protéine se localise dans les dendrites, est apparu comme un acteur potentiellement important de la plasticité neuronale. Au cours des vingt dernières années, de nombreux travaux ont démontré

le rôle majeur de Arc dans les processus de plasticité synaptique qui sous-tendent l'apprentissage et la mémoire. Arc s'est rapidement démarquée par l'extrême finesse de sa régulation. Depuis la production et le transport des ARNm jusqu'à la synthèse et la dégradation de la protéine, chaque étape est finement contrôlée par l'activité neuronale. Si Arc régule la plasticité neuronale via de nombreux mécanismes, le lien étroit qu'elle entretient avec le cytosquelette est à l'origine de la majorité de ses fonctions cellulaires décrites à ce jour. Arc est induite dans de nombreux paradigmes d'apprentissages et joue un rôle majeur dans la formation et la consolidation de la mémoire. Arc apparaît aujourd'hui comme un acteur majeur de la plasticité neuronale capable d'assurer un couplage extrêmement fin entre les différents patrons d'activité synaptique et les modifications durables du fonctionnement neuronal au cours de l'apprentissage.

1. Arc, caractéristiques générales et spécificités

La première description de cette protéine par le groupe de Paul Worley est à l'origine de son nom le plus communément utilisé aujourd'hui, à savoir Arc pour *Activity-Regulated and Cytoskeleton-associated protein* codée par le gène *arc* (Lyford et al., 1995). Ce nom lui a été attribué en raison des principales caractéristiques mises en évidence au cours de cette étude, à savoir son induction rapide en réponse à l'activité neuronale et ses nombreuses interactions avec le cytosquelette.

a. Du gène à la protéine

La protéine Arc est codée par le gène *arc/arg3.1*, situé sur le chromosome 8 chez l'Homme et sur le chromosome 15 chez la souris. Ce gène constitué de 4500 paires de bases (Collins et al.), comporte 3 exons et n'est présent qu'en une seule copie dans le génome. Le gène *arc* est retrouvé uniquement chez les vertébrés et sa séquence est hautement conservée au sein de ce groupe. Le gène *arc* code pour un ARNm de 2948 pb chez l'Homme et 3059 pb chez la souris.

La région 3' non traduite de l'ARNm contient deux séquences de régulation de type dendritic targeting element (DTE), de 350 et 370 nucléotides, qui jouent un rôle dans l'adressage dendritique de Arc (Kobayashi et al., 2005). Cette région non codante contient également une

séquence de déstabilisation des ARNm impliquée dans la régulation du renouvellement des messagers (Link et al., 1995, Lyford et al., 1995). L'analyse des cadres ouverts de lecture présents dans ces ADNc prédit une protéine de 396 acides aminés présentant un poids moléculaire de 45 kDa

La protéine Arc traduite à partir de ces ARNm possède un poids moléculaire apparent de 55 kDa. D'un point de vue biochimique, Arc est une protéine hydrophile qui présente un point isoélectrique de 4,5. La séquence de la protéine ne présente pas de domaines hydrophobes, ce qui suggère que Arc n'est pas une protéine sécrétée et qu'elle n'interagit *a priori* pas avec la membrane plasmique. L'étude de la structure tertiaire de la protéine révèle la présence d'un domaine coiled-coil à l'extrémité N-terminale (terminaison amine) et d'un domaine d'homologie aux spectrines dans sa partie C-terminale (terminaison carboxyle). L'extrémité C-terminale de la protéine contient également une séquence *PEST* (P, Proline, E, acide glutamique, S, serine, T thréonine) qui est impliquée dans l'adressage de Arc vers le protéasome (Rao et al., 2006). La séquence de Arc contient également des sites d'interaction avec l'endophiline 3 et la dynamine 2, des protéines impliquées dans la machinerie d'endocytose (Chowdhury et al., 2006) (**Figure 14**). Une étude récente a identifié trois régions de régulation de la localisation nucléaire de Arc (Korb et al., 2013). La protéine contient une séquence d'entrée au noyau de type Pat7-NLS (Nuclear Localization Signal) dans sa partie C-terminale ainsi qu'une séquence d'export NES (Nuclear Export Signal). Arc contient également un domaine de rétention au noyau, NRD (Nuclear Retention Domain) (**Figure 14**). Ces séquences sont impliquées dans la régulation du trafic de la protéine par l'activité neuronale. La protéine Arc subit également des modifications post-traductionnelles. En effet, des sites prédictifs de phosphorylation ont été identifiés dans sa séquence protéique, notamment des sites de phosphorylation par la protéine kinase c (PKC) et CAMK II (Lyford et al., 1995). Une interaction directe entre Arc et CAMK II a ensuite été montrée dans un modèle *in vitro* de culture de neuroblastes (Donai et al., 2003). La séquence de *arc* contient également des sites de fixation pour des enzymes de type ligase telles que la protéine E3 *ubiquitin-protein ligase 3A* (Ube3A) et la protéine RING Domain ubiquitin-ligase Triad3A. Ces ligases ubiquitylent Arc au niveau des lysines 268 et 269 et favorisent sa dégradation par le protéasome (Greer et al., 2010, Mabb et al., 2014). La protéine peut également être modifiée par sumoylation sur les lysines 110 et 268 et ceci joue un rôle important dans l'endocytose des récepteurs AMPA (Craig et al., 2012).

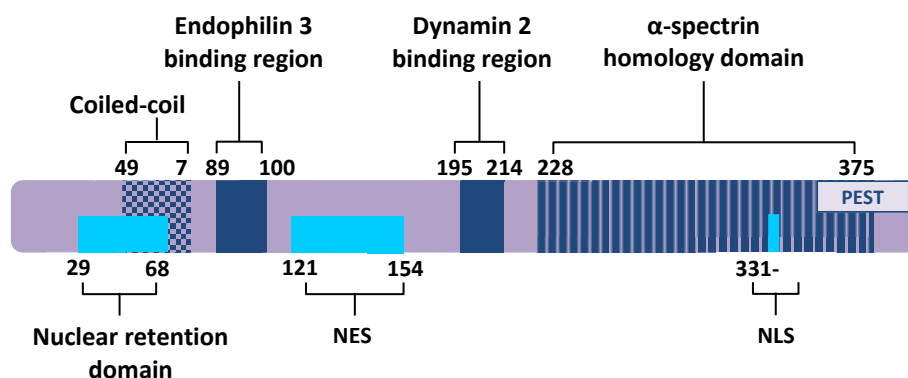


Figure 14 : Représentation schématique de la séquence protéique de Arc

La séquence protéique de Arc contient un domaine d'homologie aux spectrines dans sa région C-terminale. Le domaine coiled-coil situé en N-terminale est impliqué dans la formation de dimères de protéine. La séquence contient deux sites d'interaction avec des protéines impliquées dans l'endocytose des AMPAR. La séquence PEST située dans la partie C-terminale est impliquée dans l'adressage de Arc vers le protéasome. Enfin, la protéine Arc possède trois sites impliqués dans la régulation de son trafic entre le noyau et le cytoplasme. NLS : Nuclear Localization Sequence ; NES : Nuclear Export Signal ; PEST: P, Proline, E, acide glutamique, S, serine, T thréonine.

b. Un lien privilégié avec le cytosquelette

La séquence de Arc présente une forte homologie avec l' α -spectrine qui est un constituant majeur du cytosquelette. De plus, la séquence prédictive de la protéine indique la présence d'un domaine « spectrine-like » (Lyford et al., 1995). Ces domaines sont importants pour les interactions protéiques au sein du cytosquelette et agissent comme une plateforme pour la formation de complexes macromoléculaires (Djinovic-Carugo et al., 2002). Leur implication dans les interactions entre molécules au sein de la famille des protéines de type spectrine suggère que Arc s'associe à des complexes de protéines du cytosquelette. Une étude a récemment montré que ces domaines sont impliqués dans l'oligomérisation de Arc (Myrum et al., 2015). Ce phénomène semble extrêmement dynamique et Arc est présente sous forme de monomères et d'oligomères dans la cellule.

L'interaction directe de Arc avec le cytosquelette d'actine a été mise en évidence par des analyses biochimiques qui ont montré que la protéine co-précipite avec la F-actine. Cette interaction semble spécifique de Arc puisqu'elle n'est pas retrouvée pour le produit d'autres IEG tels que *c-Fos*, *Zif268* ou encore *Jun-D*. En revanche, cette interaction est perdue dans des préparations d'actine purifiée qui ne contiennent pas les protéines liées au cytosquelette d'actine, telles que la tropomyosine et les spectrines. Ces observations suggèrent que

l'interaction Arc/F-Actine n'est pas directe mais se ferait par l'intermédiaire de protéines associées à l'actine (Lyford et al., 1995). La ou les protéines impliquées restent à ce jour encore inconnue.

Les liens entre Arc et le cytosquelette ne semblent pas se limiter à l'actine. En effet, en 2006, des travaux à nouveau issus du groupe de Paul Worley ont montré une interaction directe entre Arc et des composants du cytosquelette impliqués dans l'endocytose des protéines membranaires (Chowdhury et al., 2006). L'utilisation d'un crible double-hybride chez la levure a permis de montrer que Arc interagit directement avec l'endophilin 3 et la dynamine 2. La dynamine 2 est une GTPase de la superfamille des dynamines, impliquée dans la scission entre les vésicules de clathrine et la membrane plasmique (Praefcke and McMahon, 2004). Cette protéine se lie aux phospholipides membranaires via son domaine de type « plekstrin-homology » (PH) et engage des interactions protéine-protéine au travers d'un domaine type « proline-rich » (PRD) (Hinshaw, 2000). De manière surprenante, la dynamine 2 interagit avec Arc via son domaine PH et non son domaine PRD. L'endophiline 3 est une protéine cytoplasmique contenant un domaine src-homology 3 (SH3) et capable d'interagir avec la dynamine et l'amphiphysine pour réguler le recyclage des vésicules de clathrine (Conner and Schmid, 2003). L'interaction de Arc avec ces deux protéines se fait via deux domaines distincts et entraîne sa relocalisation à proximité des vésicules d'endocytose. Dans les neurones, Arc se localise à proximité des vésicules d'endocytose des récepteurs au glutamate de type AMPA et favorise leur endocytose par le biais de son interaction avec l'endophiline et la dynamine (Chowdhury et al., 2006).

Ce lien étroit avec le cytosquelette est à l'origine de la majorité des fonctions cellulaires de Arc connues à ce jour. De l'actine à la machinerie d'endocytose, Arc est physiquement associée à des mécanismes cellulaires importants pour la plasticité neuronale, depuis la régulation de la structure du neurone jusqu'à la modulation de l'efficacité synaptique.

c. *arc*, un IEG du système nerveux central

Les conditions même de la découverte de Arc constituent le premier argument en faveur de sa régulation par l'activité neuronale. Initialement identifiée par un criblage de gènes induits dans le cerveau de rats soumis à des chocs électroconvulsifs, Arc a immédiatement rejoint la catégorie des IEG. Bien que présentant certaines spécificités, Arc partage de nombreuses

caractéristiques avec les gènes de cette famille à commencer par la principale, l'induction rapide en réponse à des signaux chimiques ou électriques (Link et al., 1995, Lyford et al., 1995). Des études réalisées dans des modèles *in vitro*, de culture de cellules PC12, suggèrent fortement que la capacité de Arc à répondre à l'activité est une propriété extrêmement conservée de cette protéine. Dans ces modèles simplifiés, son expression est régulée rapidement en réponse à des signaux chimiques extracellulaires. L'expression des transcrits de Arc, quasi-indétectable au niveau basal, est fortement augmentée dès 30 minutes et se maintient jusqu'à 4 heures après une stimulation par des facteurs de croissance (NGF, Nerve growth factor) (Lyford et al., 1995).

L'analyse par hybridation *in situ* du niveau d'expression des transcrits de Arc dans différents tissus chez le rat a montré que son expression est très largement majoritaire dans le cerveau. En effet, bien que détectable dans le foie, les reins, les muscles ou encore le cœur, son expression est extrêmement faible dans ces tissus périphériques en comparaison au SNC (Link et al., 1995). Au cours du développement, les transcrits de Arc sont détectables dans le cerveau à partir du huitième jour après la naissance et atteignent leur maximum d'expression à 21 jours post-natal. Ce patron d'expression au cours du développement a été montré pour d'autres IEG et suggère fortement que Arc pourrait être impliquée dans des phases du développement dépendantes de l'activité neuronale (Worley et al., 1991). Au sein du SNC, Arc est très majoritairement exprimée dans le cerveau antérieur et reste quasiment indétectable dans la matière blanche. Arc est faiblement exprimée au niveau basal mais induite très rapidement en réponse à une modification de l'activité neuronale (Link et al., 1995, Lyford et al., 1995). De manière intéressante, l'expression basale de Arc est légèrement plus élevée dans le néocortex que dans le reste du cerveau antérieur, suggérant qu'elle est régulée par l'activité synaptique excitatrice physiologique. Cette expression basale est fortement diminuée par l'injection systémique du MK801, un antagoniste des NMDAR. L'expression constitutive de Arc a ensuite été décrite comme reflétant sa capacité à répondre à l'activation des NMDAR par l'expérience dans le cortex. En réponse à une activité neuronale intense, l'expression de Arc augmente dans le cortex, l'hippocampe et le striatum et s'étend dans l'amygdale, le noyau réticulé du thalamus ou encore le cortex pyriforme (Link et al., 1995, Lyford et al., 1995). Les premières études de Link et de Lyford se sont basées sur l'application de chocs électro-convulsifs chez le rat qui permet d'induire une activité neuronale massive dans le cerveau. En réponse à ces stimulations, l'expression des transcrits de Arc augmente de manière considérable dans l'hippocampe dès 30 minutes et se maintient

jusqu'à 8 heures. Cette induction est plus transitoire dans le cortex où l'expression des transcrits revient au niveau basal dès 4 heures après stimulation (**Figure 15**). L'induction des ARNm *Arc* est préservée en présence d'un inhibiteur de la synthèse protéique, en accord avec ce qui a été décrit pour d'autres IEG ([Link et al., 1995](#), [Wallace et al., 1998](#)).

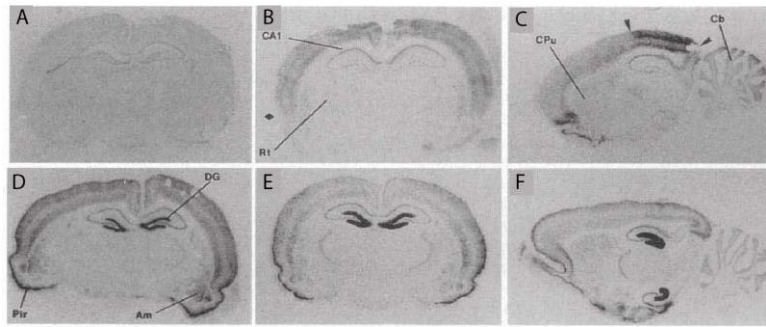


Figure 15 : Induction de Arc en réponse à des chocs électro-convulsifs

Les ARNm *Arc* sont détectés par hybridation *in situ* avec une sonde sens (A) ou anti-sens (B-F) sur des coupes coronales (A, B, D, E) ou sagittales (C, F) chez des rats soumis à des chocs électro-convulsifs, 1h (D, E, F) ou 4h (A, B, C) après l'application des stimulations. Am : Amygdale, CA1 : Champs CA1 de l'hippocampe, Cb : Cerebellum, CPu : Caudé Putamen, DG : Gyrus Denté, Pir : Cortex Pyriforme de l'hippocampe. ([Link et al., 1995](#))

Au niveau cellulaire, l'absence de co-localisation entre Arc et la GFAP (Glial Fibrillary Acidic Protein) associée à une co-localisation parfaite avec le marqueur neuronal NeuN démontre une expression strictement neuronale de la protéine ([Vazdarjanova et al., 2006](#)). Il est intéressant de noter que cette expression restreinte aux neurones n'est pas valable pour d'autres IEG tels que *c-fos* ou *c-jun*, et semble spécifique de *arc*. Dans cette même étude, les auteurs ont caractérisé le type neuronal dans lequel Arc est exprimée en induisant son expression par un protocole d'exploration d'un nouvel environnement. Dans l'hippocampe et le cortex, Arc est exprimée majoritairement dans les neurones glutamatergiques et très faiblement dans les interneurons GABAergiques alors qu'elle est induite principalement dans les neurones GABAergiques du striatum. Dans chacune de ces structures, l'expression de Arc est donc prédominante au sein de la population neuronale majoritaire qui correspond aux neurones de projection. Dans les neurones excitateurs comme inhibiteurs, Arc est toujours exprimée dans les cellules positives pour la CAMK II. La localisation cellulaire de Arc est en accord avec son implication dans la plasticité synaptique et structurelle qui accompagne l'apprentissage et la mémoire. Au niveau subcellulaire, Arc est très faiblement exprimée dans les terminaisons axonales pré-synaptiques. Elle est en revanche fortement exprimée dans les

dendrites, les densités post-synaptiques et elle est détectable dans le noyau (Irie et al., 2000, Moga et al., 2004, Rodriguez et al., 2005, Bloomer et al., 2007).

2. Mécanismes cellulaires et moléculaires impliqués dans la régulation de l'expression de Arc

Dans le SNC, Arc est régulée par une grande variété de signaux extracellulaires. Du gène à la protéine, son expression est extrêmement contrôlée dans le temps et dans l'espace au sein des neurones. La régulation de Arc reflète un couplage extrêmement efficace entre l'activité neuronale et la régulation génique qui lui confère la capacité d'encoder très finement les stimulations synaptiques pour contribuer à une réponse neuronale appropriée.

a. Mécanismes de régulation de la transcription

i. Signaux extracellulaires impliqués dans la transcription de *arc*

Dans les cellules PC12, la dépolarisation membranaire augmente les transcrits de Arc via les flux de calcium au travers des canaux calciques dépendants du voltage de type L (Waltereit et al., 2001) (Table 1). Les flux calciques dépendants des NMDAR sont également impliqués puisque l'injection systémique d'un antagoniste des NMDAR, le MK801, réduit massivement l'induction des ARNm de Arc dans l'hippocampe et le cortex en réponse à une stimulation épileptogène (Link et al., 1995, Lyford et al., 1995). Dans les cellules granulaires de l'hippocampe, l'induction des ARNm par une stimulation électrique de la voie perforante est également abolie en présence du MK801 (Steward and Worley, 2001a).

La transmission glutamatergique joue un rôle majeur dans la régulation de Arc et les NMDAR ne sont pas les seuls impliqués. Les AMPAR sont également engagés mais leur effet n'est pas synergique de celui des NMDAR. Dans des cultures de neurones corticaux, l'application d'un antagoniste des récepteurs AMPAR potentialise fortement l'activation transcriptionnelle de *arc* induite par l'activité synaptique (Rao et al., 2006). Les NMDAR et AMPAR exercent ainsi des effets opposés sur la transcription de *arc*, avec une régulation positive et négative, respectivement. Le niveau relatif d'expression de chaque récepteur pourrait ainsi être déterminant dans l'induction de Arc. Ceci suggère que le niveau d'activation respectif des

AMPA et NMDA, est intégré au niveau des voies de signalisation engagées dans l'activation transcriptionnelle de *arc*. L'activation des récepteurs métabotropiques du glutamate (mGluR) est également impliquée dans la régulation transcriptionnelle de *arc*. Dans des cultures de neurones corticaux, l'application de DHPG (Dihydroxyphenylglycine), un agoniste des récepteurs mGluR du groupe I, augmente l'expression des transcrits de Arc (Wang et al., 2009). Cette contribution apparaît cependant modeste au niveau transcriptionnel et nous verrons plus tard que les mGluR jouent un rôle important dans la régulation traductionnelle de Arc en participant notamment à la synthèse rapide et locale de la protéine (Park et al., 2008, Waung et al., 2008). Dans des neurones d'hippocampe en culture, l'analyse par « microarray » des gènes induits par le BDNF a révélé l'induction de plusieurs IEG dont *c-fos*, *zif268* et *arc* dès 20 minutes et jusqu'à 3 heures après la stimulation (Alder et al., 2003). En utilisant une approche élégante couplant le patch-clamp sur cellule entière et l'analyse des transcrits par qPCR sur cellule isolée, les auteurs ont pu relier l'intensité de la transmission synaptique avec le niveau d'expression des ARNm. Ils ont ainsi pu démontrer que l'activation transcriptionnelle de *arc* est linéairement corrélée à l'augmentation de la transmission synaptique induite par le BDNF suggérant que le taux d'ARNm *Arc* pourrait coder le niveau d'activité du neurone. Dans des neurones d'hippocampe, l'activation de son récepteur, TrkB (**T**ropomyosin **r**eceptor **k**inase **B**), par le BDNF induit une augmentation biphasique des ARNm de Arc à 3 heures et 48 heures après la stimulation (Yasuda et al., 2007). Chez des rats adultes, l'expression des ARNm dans les cellules granulaires du gyrus denté augmente dans les 2 heures suivant une micro-infusion de BDNF localement dans l'hippocampe (Ying et al., 2002). De manière intéressante cette régulation semble spécifique de *arc* puisque l'expression de *zif-268* n'est pas modifiée.

L'activation transcriptionnelle de *arc*, est également soumise à la régulation par de nombreux systèmes neuromodulateurs au sein du système nerveux central (**Table 1**). Dans des neuroblastomes de type SH-SY5Y, les ARNm de Arc sont augmentés en réponse à une stimulation des récepteurs muscariniques à l'acétylcholine (Teber et al., 2004). La stimulation des récepteurs cholinergiques en réponse à l'injection de nicotine augmente l'expression des transcrits de Arc, *in vivo* (Schiltz et al., 2005). Les systèmes serotoninergiques et noradrénergiques sont également impliqués dans la régulation de Arc (Pei et al., 2000, Serres et al., 2012). L'expression des transcrits de Arc est également modulée en réponse à l'administration de cocaïne par un mécanisme impliquant la dopamine (Fosnaugh et al., 1995, Fumagalli et al., 2009).

Modèle		Stimulation	Transcription de Arc	Référence
Lignées Cellulaires	Cellules PC12	KCl Dépolarisation membranaire	↑	Waltereit et al, 2001
	SH-SY5Y	Carbachol Agoniste des Récepteurs muscariniques	↑	Teber, 2004
Cultures primaires	Neurones corticaux	AMPA	↓	Rao et al, 2006
		GYKI 52466 Antagoniste des AMPAR	↑	Rao et al, 2006
		DHPG Agoniste des mGluR	↑	Wang et al, 2009
	Neurones d'hippocampe	BDNF	↑	Alder, 2003 Yasuda, 2007
Cerveau	Hippocampe	Chocs électroconvulsifs	↑	Link, 1995 Lyford, 1995
		BDNF	↑	Ying et al, 2002
	Cortex	Chocs électroconvulsifs	↑	Link, 1995 Lyford, 1995
		MK801 Antagoniste des NMDAR	↓	Link, 1995 Lyford, 1995
		Stimulation pharmacologique de la libération de 5-HT	↑	Pei, 2000
		RX 821002 Antagoniste des récepteurs adrénergiques α_2	↑	Serres, 2012
	Striatum	Stimulation pharmacologique de la libération de 5-HT	↑	Pei, 2000
		RX 821002 Antagoniste des récepteurs adrénergiques α_2	↑	Serres, 2012

Table 1 : Signaux extracellulaires impliqués dans la régulation transcriptionnelle de Arc

ii. Voies de signalisation impliquées dans la transcription de *arc*

Le large panel de stimuli qui converge vers l'activation transcriptionnelle de *arc* suggère que son promoteur est capable de répondre à l'activation de multiples voies de signalisation. Il

pourrait ainsi permettre l'intégration de multiples signaux extracellulaires au cours de la transcription dépendante de l'activité neuronale. (**Figure 16**).

En 2001, une étude menée par Waltereit et ses collaborateurs apportait les toutes premières informations concernant les sites de régulation présents dans le promoteur de *arc* (Waltereit et al., 2001). Les auteurs ont identifié deux sites SRE situés à 0,9 et 1,5 kb en amont du site d'initiation de la transcription de *arc*. Cependant, ces séquences promotrices présentent une faible capacité à répondre à des élévations d'AMPC, contrairement à l'ARNm endogène qui est fortement induit dans ces mêmes conditions. Ceci suggère très fortement l'existence d'autres sites de régulation majeurs à des positions plus distales.

Dans les années qui suivirent, l'avancée considérable des techniques d'analyse du génome et de biologie moléculaire, contribuèrent à une identification plus précise des sites de régulation de Arc et par là, une meilleure compréhension des mécanismes cellulaires en amont. En 2009, par l'utilisation de la méthode de clivage des sites hypersensibles par la DNase I, Pintchovski et ses collaborateurs identifièrent deux sites de régulation situés 6,5 kb et 1,4 Kb en amont du site d'initiation de la transcription (Pintchovski et al., 2009). L'élément le plus distal est un site SRE, plus distal que les deux autres précédemment décrits par Waltereit et ses collaborateurs. Ce site est nécessaire à l'induction de Arc par l'activité synaptique, la forskoline et le BDNF. L'analyse par immuno-précipitation de la chromatine de cet élément de régulation a montré qu'il est capable de lier le SRF dans des cultures de neurones corticaux. L'implication de ce site distal de régulation par le SRF a également été mise en évidence dans des cultures de cellules de Purkinje. Dans ce modèle, le SRF recrute le facteur MAL, un co-activateur régulé par l'actine (Smith-Hicks et al., 2010). Cette étude a également révélé l'existence d'un site ZRE (Zeste-like Response Element), qui est requis pour l'induction de *arc* mais dont le cofacteur reste inconnu à ce jour. Zeste est un facteur de transcription chez les invertébrés pour lequel aucun orthologue mammifère n'a été décrit. Bien qu'il semble impliqué dans la régulation transcriptionnelle de *arc*, les voies de signalisation en amont de son activation restent à déterminer. Le gène *arc* est également une cible du facteur de transcription MEF2 (Myocyte Enhancer Factor 2) (Flavell et al., 2006). Si ce site SRE distal semble jouer un rôle majeur, l'identification d'autres sites de régulation à ses abords a apporté de nouvelles perspectives quant à la régulation transcriptionnelle de *arc*. Les travaux de Kawashima et ses collaborateurs ont révélé l'existence d'un site unique de régulation dans le promoteur de *arc* qui consiste en un regroupement de plusieurs sites de fixation pour des facteurs de transcription régulés par l'activité. Ce site de 100 paires de bases

situé 7 kb en amont du site d'initiation de la transcription de *arc* a été baptisé SARE pour Synaptic Activity Response Element en raison de sa très haute capacité à répondre à l'activité synaptique (Kawashima et al., 2009). Cet élément comprend le site SRE distal précédemment identifié, un site CRE de fixation pour CREB ainsi qu'un site de fixation pour MEF2. La fixation concomitante des trois facteurs est requise pour la réponse optimale du SARE à l'activité neuronale suggérant fortement une coopération entre ces différents facteurs. Son activation est dépendante de l'activation des voies CAMK et MAPK de type ERK. Ce site apparaît comme un intégrateur de différentes voies de signalisation activées en réponse à une activité synaptique et il permettrait d'expliquer la très forte capacité du promoteur de *arc* à répondre à des changements d'activité du neurone. L'efficacité de la réponse transcriptionnelle de *arc* repose également sur un mécanisme extrêmement rapide de recrutement de la polymérase au niveau du promoteur. Pour certains gènes dits « rapides », la machinerie transcriptionnelle est déjà positionnée en aval du site d'initiation de la transcription permettant une activation transcriptionnelle la plus rapide possible en réponse à l'activité neuronale (Saha et al., 2011).

Le couplage entre l'activité synaptique et l'initiation de la transcription est dépendant de cascades de signalisation intracellulaires aboutissant à l'activation des sites régulateurs de la transcription présents au niveau du promoteur de *arc*. A la convergence de nombreuses voies de signalisation régulées par l'activité, la voie ERK semble jouer un rôle clé dans l'activation transcriptionnelle de *arc* (**Figure 16**). La première démonstration d'une implication de la voie ERK provient d'une étude menée en 2001 dans un modèle *in vitro* d'induction de Arc par l'AMPc (Waltereit et al., 2001). Dans des cellules PC12, l'expression des transcrits de Arc est augmentée suite à l'application de forskoline, un activateur de l'adénylate cyclase, capable de stimuler la production d'AMPc. Cette induction également retrouvée dans des neurones d'hippocampe en culture est dépendante de l'activation de la PKA en aval de l'AMPc mais semble indépendante de l'activation du facteur de transcription CREB lui-même ciblé par la PKA. En revanche, l'application d'un inhibiteur de ERK abolit l'effet de la forskoline sur l'expression des ARNm de Arc démontrant ainsi le recrutement des ERK en aval de la PKA. De manière intéressante, l'induction de Arc par l'AMPc n'est pas reproduite dans d'autres types cellulaires exprimant faiblement B-raf, qui est nécessaire à l'activation des ERK par la PKA. Ceci suggère fortement qu'il existe une voie de régulation spécifiquement neuronale de l'expression de Arc qui recruterait préférentiellement le maillon PKA/B-Raf/ERK. Si le maillon PKA/CREB ne semble pas engagé dans ce modèle, cela n'exclut pas que CREB soit

impliqué en aval de ERK au travers notamment de la kinase MSK1 (Mitogen- and stress-activated protein kinase-1). La kinase MSK1 est une cible nucléaire de ERK qui régule l'expression génique au travers notamment de la phosphorylation du facteur de transcription CREB. Elle régule également le niveau de phosphorylation des histones H3 qui contribue à la relaxation de la chromatine au cours de l'activation de la transcription. En accord avec l'implication de cette kinase, l'induction de Arc par le BDNF est très fortement diminuée dans un modèle murin d'inactivation génétique de MSK1 de type « *Kinase-Dead* » (Correa et al., 2012). Egalement en faveur d'une implication de la voie ERK, l'inhibition du facteur de transcription Elk-1, une cible nucléaire de ERK, diminue l'induction des transcrits de Arc en réponse à la cocaïne (Besnard et al., 2011). Elk-1 est un cofacteur du SRF impliqué dans l'activation de la transcription dépendante des sites SRE. La voie ERK pourrait ainsi contrôler la transcription de *arc* au niveau de différents sites de régulation via ses multiples cibles nucléaires. L'action convergente de plusieurs facteurs en aval de cette voie pourrait contribuer à une activation rapide et importante de la transcription de *arc* nécessaire au couplage efficace entre l'activité synaptique et l'expression génique. L'implication directe des voies ERK dans l'induction de Arc par le BDNF a été démontrée *in vivo* et *in vitro*. Dans des neurones corticaux en culture, l'application, du U0126, un inhibiteur de ERK réduit massivement l'induction des transcrits de Arc par le BDNF (Yasuda et al., 2007). Dans l'hippocampe, l'induction d'une LTP par micro-infusion de BDNF dans l'hippocampe dépend de l'activation de la voie ERK. L'inhibition pharmacologique de ERK localement dans l'hippocampe abolit l'induction des ARNm de Arc observée en réponse à l'application de BDNF (Yin et al., 2002, Ying et al., 2002). Ces résultats montrent que l'implication de ERK dans l'induction de Arc est également retrouvée *in vivo* dans des protocoles d'induction de la plasticité.

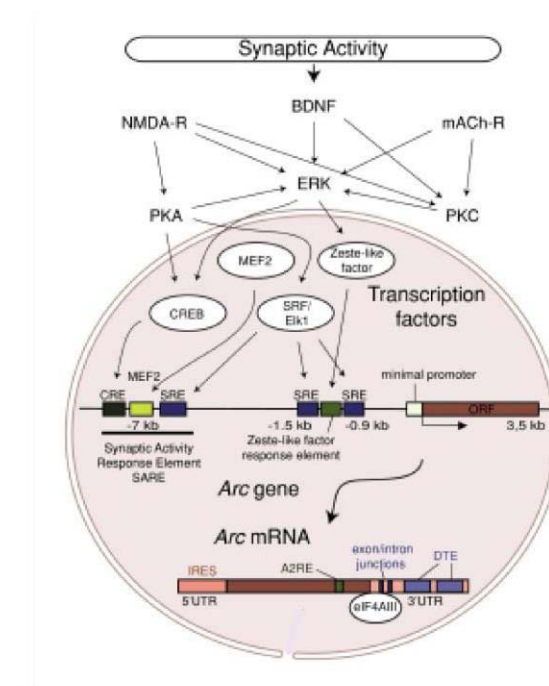


Figure 16 : Voies de signalisations impliquées dans l'activation transcriptionnelle de Arc

Représentation schématique du promoteur de *arc* et des différentes séquences de régulation en amont de la séquence codante de *arc*. L'expression de Arc est induite par des cascades de signalisation qui régulent des facteurs de transcription tels que Elk-1 et CREB, impliqués dans l'activation transcriptionnelle de Arc. (Bramham et al., 2010).

b. Mécanismes de régulation des ARNm

Dès 1995, les premières études de l'expression des transcrits de Arc par hybridation *in situ*, révélèrent une propriété étonnante de l'ARNm de Arc, à savoir sa localisation dendritique (Link et al., 1995, Lyford et al., 1995). En effet ce type de régulation était tout à fait inattendu de la part d'un IEG et *arc* reste à ce jour le seul gène de cette famille dont les ARNm sont rapidement transportés vers les dendrites.

i. Contrôle spatial de l'expression des ARNm

De la même manière que pour sa synthèse, le transport dendritique de l'ARNm de Arc est rapide et dépend de l'activité neuronale. La première démonstration par Lyford et ses collaborateurs a révélé qu'il s'accumule dans les dendrites des cellules granulaires de l'hippocampe dans les 15 minutes suivant l'application de chocs électro-convulsifs (Lyford et al., 1995, Wallace et al., 1998) (Figure 17). Ce phénomène est indépendant de la synthèse

protéique et semble donc lié à la présence de séquences spécifiques dans l'ARNm lui-même et non pas dans les protéines néo-synthétisées avec lesquelles il pourrait être transporté (Wallace et al., 1998). Les ARNm de Arc sont relocalisés vers les dendrites dans des délais relativement courts en réponse à l'activité synaptique suggérant fortement que leur adressage dépend de mécanismes de transport actif. La rapidité de leur déplacement, estimée à 65 μm / min (Dynes and Steward, 2007) ainsi que leur association à des moteurs moléculaires de type Kinésine (Kanai et al., 2004) sont également en faveur d'un transport actif.

La régulation du transport des ARNm dépend de séquences de régulation situées dans leurs portions non codantes et qui permettent la fixation de protéines impliquées dans leur adressage. La région 3' non codante (3'UTR) de l'ARNm de Arc contient deux éléments de régulation de type cis-acting DTE qui ont été montrés comme étant nécessaires à la localisation dendritique d'un ARNm rapporteur *in vitro* dans des neurones d'hippocampe (Kobayashi et al., 2005). En légère contradiction avec ces données, dans un modèle de micro-injection d'ARNs fluorescents directement dans le cytoplasme de neurones d'hippocampe, la suppression de la région 3' non codante n'altère pas l'adressage dendritique des ARNm de Arc (Gao et al., 2008). Ces travaux ont conduit à l'identification d'un autre site de régulation situé cette fois, au sein même de la séquence codante de *arc*. Il s'agit d'une séquence de 11 nucléotides appelée A2 response element (A2RE) qui permet la fixation de protéines de type heterogenous nuclear ribo nucleoprotein (hnRNP) A2. Dans les neurones d'hippocampe, cette séquence est requise pour le transport dendritique de l'ARNm de Arc mais aussi de l' α -CAMK II. Ces deux ARNm transitent dans les mêmes granules de transport suggérant qu'ils pourraient faire l'objet d'une co-régulation (Gao et al., 2008). Concernant la discordance des données quant à l'implication de la région 3'UTR, les auteurs émettent l'hypothèse qu'elle serait impliquée dans le transport basal des ARNm alors que la région A2RE serait impliquée dans un transport dépendant de l'activité. En effet, il a été montré que le site A2RE peut être ciblé par le CArG box binding factor A (CBF-A) qui contrôle la localisation de *Arc* et de la CAMK II α via un mécanisme régulé par les AMPAR et NMDAR (Raju et al., 2011).

Les messagers destinés à être transportés sont emballés dans des granules de transport formés d'un complexe de protéines associées aux ARNm. Il existe différents types de granules de transport mais la majorité du transport de messagers vers les dendrites se fait via des granules de type Ribo-Nucleoproteins Particle (RNPs) (**Figure 17**). La séquestration dans ces granules, leur assure notamment de ne pas être pris en charge précocement par la machinerie traductionnelle. Parmi les protéines associées aux ARNm, on retrouve notamment

des moteurs moléculaires permettant le transport du noyau vers les prolongements dendritiques mais également des protéines de la machinerie traductionnelle ainsi que des protéines impliquées dans la stabilité des ARNm (Bramham and Wells, 2007, Buxbaum et al., 2015). Les granules contenant l'ARNm de Arc sont transportées par des moteurs moléculaires de type kinésine, au travers de l'interaction avec KIF5, la chaîne lourde de la kinésine (Kanai et al., 2004). Ces granules de transport contiennent notamment les protéines *Fragile-X mental retardation protein* (FMRP) et Pur- α qui sont impliquées dans l'inhibition de la traduction au cours de l'adressage dendritique des ARNm (Zalfa et al., 2003, Kanai et al., 2004). La protéine FMRP régule le transport, la stabilisation et la traduction d'un grand nombre d'ARNm dont une majorité est associée à des fonctions synaptiques (Darnell et al., 2011). Cette protéine joue un rôle clé dans la régulation de la plasticité synaptique et structurale, et l'altération de ses fonctions est à l'origine d'importants déficits cognitifs (Bhakar et al., 2012). L'absence ou la mutation de FMRP sont associées au syndrome de l'X fragile caractérisé par un retard mental et des comportements autistiques et représentant l'une des causes les plus fréquentes de retard mental héréditaire. Dans les dendrites, FMRP régule la traduction des ARNm auxquels elle est associée et nous verrons plus tard qu'elle joue un rôle important dans le contrôle de la traduction locale de Arc (Zalfa et al., 2003, Darnell et al., 2011). Au sein des granules de transport, FMRP joue également un rôle de protéine adaptatrice dans l'interaction avec les moteurs moléculaires impliqués dans le transport dendritique des messagers (Dictenberg et al., 2008).

ii. Rôle de l'activité dans l'adressage dendritique

L'activité synaptique occupe également une place centrale dans l'adressage de ses ARNm. Si l'expression des messagers est augmentée de manière large dans les dendrites en réponse à des stimulations neuronales massives, elle est plus restreinte dans le cas d'activations synaptiques locales. Au travers d'une série d'expériences élégantes, le groupe de Paul Worley a montré que l'adressage de l'ARNm de Arc se fait spécifiquement vers des portions dendritiques qui ont été récemment activées (Steward et al., 1998). Cette étude est basée sur un protocole de stimulation à haute fréquence, capable d'induire une LTP au niveau des synapses de la voie perforante, formées entre les projections du cortex entorhinal et les cellules granulaires du gyrus denté de l'hippocampe. L'organisation topographique des projections entorhinales se faisant par gradient le long des dendrites des cellules granulaires, il est possible d'activer spécifiquement une bande de synapses de la couche granulaire

contenant ces dendrites en activant sélectivement certaines régions du cortex entorhinal. Les auteurs ont ainsi pu démontrer qu'une stimulation du cortex entorhinal médian qui active spécifiquement la couche moléculaire moyenne induit une augmentation des ARNm de *Arc* localement dans cette zone. Cette accumulation survient 1 heure après la stimulation et est précédée d'une forte induction des transcrits dans le soma des cellules granulaires dès 30 minutes. Cette étude qui offrait la première démonstration d'un adressage spécifique des transcrits néo-synthétisés de *Arc* vers des synapses activées ouvrit la voie vers de nombreuses questions et hypothèses autour d'un rôle local de *Arc* au niveau des dendrites dans l'établissement d'une plasticité neuronale à long terme induite par l'activité. Quelques années plus tard, des travaux issus à nouveau du groupe de Paul Worley, ont montré que cet adressage dendritique dépend de l'activation des NMDAR dans ce même modèle (Steward and Worley, 2001a). La séquence d'événements cellulaires reliant l'activation des NMDAR à l'adressage dendritique des ARNm de *Arc* reste partiellement comprise mais semble dépendre notamment du réseau d'actine dendritique ainsi que de l'activation des voies ERK. Les stimulations à haute fréquence induisant une relocalisation des transcrits de *Arc* ont également pour conséquence d'augmenter la polymérisation de l'actine au niveau dendritique et ce, sous la dépendance de l'activation des NMDAR (Fukazawa et al., 2003). Au niveau des dendrites de la couche granulaire du DG, cette densification du réseau d'actine est nécessaire à l'adressage de l'ARNm de *Arc* vers les synapses activées (Huang et al., 2007). Ce mécanisme dépend de l'activation locale des NMDAR et de la kinase Rho impliquée dans la polymérisation de l'actine. Ces données sont en accord avec le lien étroit que *Arc* entretient avec les partenaires du cytosquelette. Nous verrons plus loin que la protéine *Arc* est elle-même impliquée localement dans la polymérisation de l'actine suggérant son implication dans des boucles positives de régulation de l'actine au cours de l'établissement de la plasticité. Les travaux de Huang et ses collaborateurs ont également montré que l'activation locale de ERK est requise pour l'adressage des messagers de *Arc* vers les dendrites.

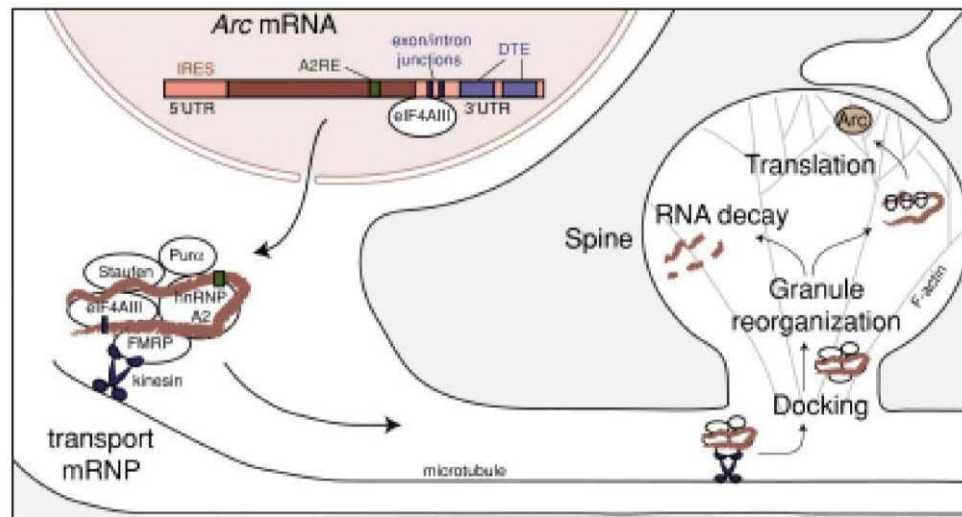


Figure 17 : Régulation du transport de l'ARNm de Arc

L'ARNm néotranscrit est pris en charge par des granules de transport via des sites de régulation présents dans sa séquence. L'adressage dendritique des ARNm est assuré par le réseau de microtubules et leur stabilisation dans ce compartiment dépend du cytosquelette de F-actine. Suite à leur transcription, les ARNm sont dégradés via le mécanisme de NMD. A2RE : A2 Response Element ; DTE : Dendritic targeting Element ; UTR : Untranslated Region ; IRES : Internal Ribosome Entry Site.

iii. Contrôle temporel de l'expression des ARNm

Au vu de l'ensemble de ces données, il apparaît clairement que l'activité neuronale joue un rôle central dans le contrôle spatio-temporel de l'expression de *Arc* notamment via la régulation rapide de son activation transcriptionnelle ainsi que de son adressage spécifique vers le compartiment dendritique. Un autre événement clé dans la délimitation spatiale et temporelle de l'expression de *Arc* au sein du neurone consiste en la régulation de la stabilité de ses ARNm. Dans leur étude publiée en 2001, Steward & Worley avaient émis l'hypothèse que la dégradation régulée des ARNm puisse être impliquée, au moins en partie, dans la restriction spatiale de l'expression des ARNm qu'ils observaient. En effet, leur accumulation dans certaines portions dendritiques semblait se faire au détriment des régions alentours suggérant fortement qu'un mécanisme de dégradation avait réprimé l'expansion des messagers (Steward and Worley, 2001a).

Dans les neurones, le contrôle cytoplasmique de l'expression génique occupe une place centrale, en raison notamment de la très grande asymétrie fonctionnelle associée à la mise en place de la plasticité synaptique dans des compartiments spécifiques de ces cellules. Si la régulation de l'adressage des ARNm est une étape clé, il apparaît que la régulation de leur

stabilité est tout aussi importante dans la définition des fenêtres spatiales et temporelles de leur traduction. En 2007, une étude publiée par Giorgi et ses collaborateurs démontre qu'un mécanisme de dégradation des ARNm, appelé **nonsense mediated decay** (NMD) joue un rôle clé dans la régulation de l'efficacité synaptique et de l'expression de Arc (Giorgi et al., 2007) (**Figure 18**). Le NMD est un mécanisme impliqué dans l'élimination d'ARNm aberrants ou tronqués identifiés par la présence de codons STOP prématurés situés à proximité et en amont d'un site d'épissage (Chang et al., 2007). Au cours de l'épissage des pré-ARNm, un complexe de protéines appelées exon junction complex (Piechota et al.) est déposé au niveau de chaque site d'épissage. Au cours de la traduction, l'arrivée du ribosome au niveau d'un codon STOP entraîne le recrutement d'une protéine clé du NMD, le facteur UPF1, qui se lie au complexe EJC entraînant ainsi la dégradation de l'ARNm. Ce mécanisme n'est cependant pas limité à un contrôle de qualité et certains messagers dits normaux, comme c'est le cas pour *Arc*, sont des cibles naturelles du NMD (Giorgi et al., 2007, Peebles and Finkbeiner, 2007). La présence de deux introns dans la région 3' non codante de *arc* aboutit à la formation d'un complexe EJC en aval du codon STOP, suffisamment proche de ce codon pour être détecté par le facteur UPF1 en fin de traduction. Dans cette étude, les auteurs montrent que l'ARNm de Arc co-localise avec le facteur EI4AIII, une protéine clé de la voie NMD. Dans des cultures de neurones corticaux, la perte d'expression d'EI4AIII, aboutit à une augmentation de l'expression des ARNm et de la protéine Arc sans altérer la distribution subcellulaire de la protéine. Ces données suggèrent que le NMD ne serait pas impliquée dans l'adressage dendritique des messagers mais plutôt dans la restriction temporelle de l'expression de la protéine. Ce mécanisme permet une dégradation rapide de l'ARNm après son premier cycle de traduction et limite ainsi le nombre de protéines produites à partir d'un même messager. Ce phénomène est particulièrement intéressant dans le cas de Arc car il permettrait une restriction temporelle très fine de l'expression protéique résultant en une bouffée d'expression de Arc efficacement corrélée à l'activité synaptique. Au vu de l'intensité de l'activation transcriptionnelle de *arc*, ce mécanisme semble crucial pour assurer un couplage cohérent entre la durée de l'activité synaptique et la production de la protéine qui en résulte. De plus, ceci est en accord avec la rapidité avec laquelle Arc revient vers son niveau d'expression basal suite à son induction par l'activité synaptique.

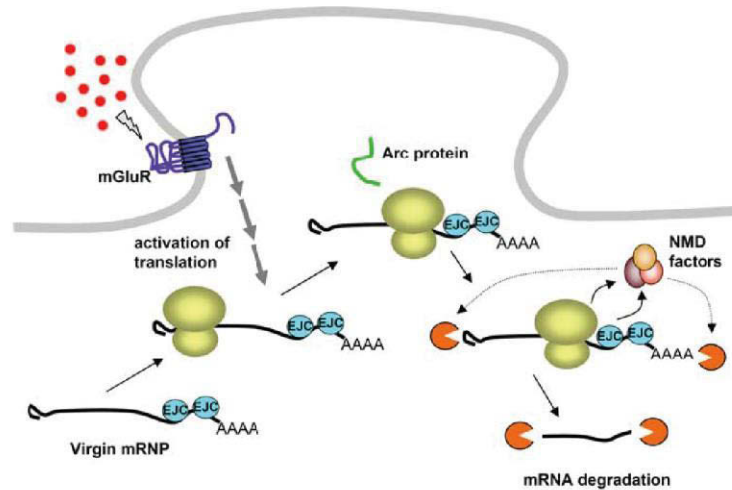


Figure 18 : Dégradation de l'ARNm de Arc par la voie du NMD

L'ARNm vierge (non traduit) de Arc est stable et peut s'accumuler dans les dendrites. À la fin du premier cycle de traduction, la proximité entre le ribosome et les deux jonctions exoniques, EJC, situées dans la partie 3'-UTR conduit à l'activation de la voie du NMD et à la dégradation rapide des messagers. Ce mécanisme contribuerait à limiter la traduction de chaque ARNm afin de ne produire qu'une copie de la protéine pour chacun d'entre eux. EJC : Exon Junction Complex ; NMD : Nonsense Mediated Decay ([Bramham, 2008](#))

c. Mécanismes de régulation de l'expression de la protéine

De la même manière que l'activité neuronale est centrale dans l'activation transcriptionnelle de *arc*, elle joue également un rôle clé dans la régulation de sa traduction. Les récepteurs et les voies de signalisation impliqués sont largement partagés par ces deux mécanismes de régulation suggérant qu'elles sont hautement synchronisées en faveur d'une augmentation rapide et intense de l'expression de Arc.

i. Régulation de la synthèse protéique

Des données obtenues, *in vitro*, dans des cultures de neurones d'hippocampes, ont montré que l'expression protéique de Arc est augmentée en réponse à la stimulation des NMDAR ainsi que des récepteurs couplés aux protéines Gs ([Bloomer et al., 2007](#)). Dans ce modèle, l'expression de la protéine Arc est augmentée 4h après une stimulation par le NMDA ainsi que par l'application d'un agoniste des récepteurs dopaminergique de type D1/D5. L'effet de ces deux composés est aboli en présence d'un inhibiteur de la PKA et la forskoline suffit en elle-même à augmenter l'expression de la protéine. Ces données indiquent que la régulation de Arc par les NMDAR au glutamate et D1/D5 à la dopamine, se fait sous la dépendance de

l'activation de la PKA. La stimulation simultanée des deux récepteurs a un effet additif sur l'induction de Arc suggérant fortement que ces deux voies convergent vers l'activation de la PKA. Nous verrons ensuite que d'autres interactions existent entre les systèmes dopaminergiques et glutamatergiques et pourraient participer à une potentiation de l'expression de Arc dans le cas d'une stimulation concomitante. Cette même étude montre que l'expression de Arc est augmentée en réponse à une stimulation par l'isoproterenol, un agoniste des récepteurs de type β -adrénergiques démontrant l'implication d'un autre système neuromodulateur que la dopamine (Bloomer et al., 2007). Cette implication du système adrénérergique a également été mise en évidence, *in vivo* au travers d'infusions locales d'un agoniste β -adrénérergique dans le complexe basolatéral de l'amygdale (BLA) (McIntyre et al., 2005). L'activation du système adrénérergique dans la BLA est impliquée dans la modulation des processus de mémorisation et de consolidation de la mémoire dans les régions cibles de l'amygdale et notamment l'hippocampe. La stimulation des récepteurs adrénérergiques, localement dans la BLA, induit une augmentation d'expression de la protéine Arc dans l'hippocampe. Cette induction protéique ne s'accompagne pas d'une augmentation des ARNm suggérant que le système adrénérergique régule spécifiquement l'expression de Arc au niveau post-transcriptionnel.

En aval des récepteurs membranaires, l'activation de voies de signalisation convergeant vers des partenaires de la machinerie traductionnelle va permettre un couplage entre l'activité synaptique et les modifications de l'efficacité de la traduction. La synthèse protéique est principalement régulée au niveau de l'initiation de la traduction qui en est son étape limitante. Cette étape repose sur la coopération de nombreux facteurs de traduction dont l'activité est principalement régulée par des changements de niveau de phosphorylation. Un des acteurs clé de ce processus est le facteur d'initiation de la traduction *eukaryotic initiation factor 4E* (eIF4E) dont la phosphorylation (P-Ser²⁰⁹) est généralement associée à une augmentation du taux de traduction CAP-dépendante de certains ARNm (Richter and Sonenberg, 2005). Ce mécanisme d'initiation est notamment régulé par ERK via Mnk1 qui phosphoryle eIF4E en réponse à l'activation de la voie ERK (Ueda et al., 2004b). La voie mTORC1 joue également un rôle important. La phosphorylation par mTORC1 de la *eIF4E-binding protein* (4EBP), une protéine associée à eIF4E aboutit à sa libération et facilite l'initiation de la traduction. Les voies ERK et mTORC, interviennent ainsi de façon synergique dans la régulation positive de la traduction en réponse à des changements d'activité neuronale. Une étude menée par le groupe de Clive Bramham a montré que ERK, au travers de ce mécanisme de régulation de la

traduction, joue un rôle majeur dans l'induction de Arc dans les processus de consolidation de la LTP dans l'hippocampe (Panja et al., 2009). Dans ce modèle *in vivo*, l'induction de Arc par la LTP dépend de l'activation de la voie ERK ainsi que de la phosphorylation d'eIF4E au travers de la kinase Mnk1. En revanche, l'expression de Arc n'est pas affectée par l'inhibition de mTORC1 suggérant que la contribution de cette voie de régulation est minoritaire dans ce contexte. Cette étude démontre que la voie ERK participe à la régulation de l'expression de Arc à plusieurs niveaux, de l'activation transcriptionnelle à la facilitation de sa traduction. En coordonnant ainsi ces différents événements cellulaires, ERK pourrait jouer un rôle clé d'intégrateur et contribuer à la rapidité et l'amplitude notables de l'induction de Arc par l'activité neuronale.

Un autre facteur de régulation de la traduction impliqué dans la régulation de l'expression de Arc est le facteur d'élongation *eukaryotic elongation factor-2* (eEF2). La phosphorylation de ce facteur est augmentée en réponse à une stimulation par les mGluR, via l'activation de sa kinase, eEF2K. Ceci est associé à une inhibition de la phase d'élongation et donc à une diminution globale de la traduction. Cependant dans des modèles de LTP ou LTD (**L**ong-**T**erm **D**epression) dépendantes de la synthèse protéique, la phosphorylation d'eEF2 est augmentée et semble favoriser la traduction de certaines sous-populations d'ARNm impliquées dans la consolidation de la plasticité dont *Arc* (Scheetz and Constantine-Paton, 1994). Dans des neurones d'hippocampe, l'induction d'une LTD par stimulation des mGluR aboutit à une augmentation de l'expression de Arc extrêmement rapide, dès 2 à 5 minutes après l'application de la stimulation (Park et al., 2008, Waung et al., 2008) qui dépend de la phosphorylation d'eEF2 induite par la stimulation des mGluR (Park et al., 2008). Ce mécanisme implique également FMRP puisque l'augmentation rapide de Arc n'est pas détectée dans des neurones KO pour cette protéine. Dans ce modèle, le défaut d'induction de Arc semble dû au fait qu'elle est très fortement exprimée de manière constitutive. En effet, FMRP régule négativement la traduction de nombreux ARNm, dont *Arc*, et son absence conduit à une levée de répression sur la traduction de Arc (Zalfa et al., 2003).

ii. Régulation spatio-temporelle de l'expression protéique

L'ensemble de ces voies de régulation traductionnelles est hautement contrôlé par l'activité neuronale et contribue également à une régulation temporelle extrêmement fine de l'induction de Arc. Du point de vue de la régulation spatiale de l'expression de Arc, la localisation

dendritique des ARNm suggère très fortement que la protéine Arc est synthétisée localement dans le compartiment dendritique (Link et al., 1995, Lyford et al., 1995, Steward and Worley, 2001a). *In vivo*, la protéine s'accumule spécifiquement dans les dendrites récemment activées des cellules granulaires de l'hippocampe après l'induction d'une LTP au niveau de la voie perforante (Moga et al., 2004). La détection de Arc en microscopie électronique révèle la présence de la protéine dans les épines dendritiques où son expression est spécifiquement augmentée dans les régions récemment activées. Les méthodes biochimiques de fractionnement subcellulaire ont également contribué à démontrer la localisation dendritique et synaptique de Arc. L'utilisation de méthodes d'incorporation de méthionine radio-marquée (³⁵S-Meth) dans des synaptoneurosomes a montré qu'il est possible d'activer localement la synthèse de Arc (Yin et al., 2002, Dong et al., 2003). Dans les modèles de stimulation par des agonistes des mGluR, la détection de Arc dans les dendrites dans des délais extrêmement courts, de 2 à 5 minutes, suggère très fortement qu'elle est traduite localement dans ces régions au détriment d'un transport depuis le soma qui nécessiterait plus de temps (Park et al., 2008, Waung et al., 2008). Il est intéressant de noter que ces inductions extrêmement rapides de Arc ne s'accompagnent pas d'augmentations des ARNm et semblent donc se faire à partir de pools d'ARNm préexistants présents dans les dendrites.

Suite à l'induction de Arc, le contrôle de sa fenêtre d'expression repose notamment sur les mécanismes impliqués dans la dégradation des protéines. Dans des cultures de neurones d'hippocampe, l'induction de Arc par le BDNF est potentialisée en présence d'un inhibiteur du protéasome (Rao et al., 2006). Il est proposé que Arc est une cible du protéasome et qu'elle y est adressée via la séquence PEST présente dans sa partie C-terminale. Arc contient également une séquence de liaison à la protéine E3 Ube3A (Greer et al., 2010). Cette enzyme est impliquée dans la dégradation dépendante du protéasome au travers de l'ubiquitinylation des protéines qui promeut leur adressage vers le protéasome. L'expression d'Ube3A est augmentée en réponse à l'activité neuronale avec un délai par rapport à la fenêtre d'expression de Arc. La liaison d'Ube3A à Arc et son ubiquitinylation subséquente favorise sa dégradation dans les heures qui suivent l'activation neuronale. Ces résultats sont, cependant, en partie remis en question par deux études plus récentes dans lesquelles l'interaction de Arc avec Ube3A ainsi que son ubiquitinylation par cette dernière ne sont pas retrouvées (Kuhnle et al., 2013, Mabb et al., 2014). Les travaux de Mabb et ses collaborateurs proposent un autre mécanisme de régulation des taux synaptiques de Arc par le protéasome par l'intermédiaire de la protéine RING Domain ubiquitin-ligase Triad3A/RNF216. Dans des

neurones corticaux, l'ubiquitinylation de Arc est augmentée en réponse à une activation neuronale. Cette ubiquitinylation dépend de la ligase Triad3A qui se lie directement à Arc et favorise ainsi sa dégradation (Mabb et al., 2014).

Du gène à la protéine, l'expression de Arc est très finement régulée au sein des neurones. La cinétique précise de la transcription et de la traduction de Arc diffère en fonction des récepteurs et voies de signalisations engagées. Ceci joue un rôle important pour le rôle joué par Arc dans différents types de plasticités (Bramham and Wells, 2007, Korb and Finkbeiner, 2011).

3. Arc, de l'exploration à l'apprentissage

Depuis la première description en 1995 de ce gène induit par l'activité neuronale, de nombreux travaux se sont attachés à étudier la régulation de Arc dans le contexte d'une tâche comportementale. Si l'expression de Arc est augmentée largement dans le cerveau en réponse à une activation massive et synchrone des neurones pendant les crises d'épilepsie, elle est également régulée de manière plus locale et spécifique en réponse à l'activité synaptique dans une grande variété de paradigmes comportementaux. Du fait de sa régulation spatio-temporelle particulièrement fine, l'expression de Arc s'est avérée être un marqueur extrêmement fiable de l'activité neuronale. De manière plus large, l'expression de Arc semble contribuer au couplage entre l'activité synaptique d'une région et le traitement de l'information au sein d'une population neuronale activée. L'induction de Arc n'apparaît pas comme le simple reflet de l'exécution d'une tâche mais survient spécifiquement dans des phases du comportement et des régions cérébrales engagés dans les processus d'apprentissage et de mémorisation.

a. Arc, un marqueur de l'activité neuronale

La première démonstration d'un lien spécifique entre l'induction de Arc et l'activité d'un réseau neuronal dans une tâche comportementale a été apportée par le groupe de Paul Worley (Guzowski et al., 1999). Dans cette étude, l'expression de l'ARNm de Arc est utilisée comme marqueur d'activité d'une population de neurones et permet d'analyser l'activité de ce réseau au cours d'une tâche comportementale. Cette nouvelle approche basée sur la détection des

ARNm par hybridation in situ a été baptisée catFISH pour *cellular compartment analysis of temporal activity by fluorescent in situ hybridization* (Guzowski et al., 2001). Le catFISH s'appuie sur le déplacement des ARNm au cours des différentes étapes depuis leur synthèse dans le noyau jusqu'à leur transport vers le cytoplasme. Suite à l'exploration d'un nouvel environnement, les pré-ARNm de Arc apparaissent dans le noyau dès 2 minutes, puis, ce marquage nucléaire disparaît après 20 minutes au profit d'un marquage cytoplasmique dû à l'export des ARNm vers le cytoplasme. Ainsi, l'accumulation cytoplasmique ou nucléaire des ARNm de Arc à un temps donné après une tâche comportementale permet de retracer l'activation d'un neurone ou d'une population de neurones au cours de cette tâche. Si cette approche ne fournit pas une information en temps réel, elle apporte toutefois des informations spatiales et temporelles sur l'activité d'un réseau.

Au travers de cette technique, Guzowski et ses collaborateurs ont pu comparer la réponse d'une population neuronale après deux sessions d'exploration successives, soit du même environnement, soit de deux environnements différents et déterminer si un même neurone était activé deux fois par un même environnement. Dans la région CA1 de l'hippocampe, les explorations consécutives du même environnement activent des populations de neurones quasiment identiques. En revanche, l'exploration de deux environnements différents active des neurones différents, très peu de neurones étant activés par les deux environnements différents. (Guzowski et al., 1999) Il est important de noter que la qualité de la résolution temporelle de cette approche est notamment due à certaines spécificités de l'ARNm de Arc. En effet, son transport rapide vers les dendrites et sa demi-vie relativement courte sont en faveur d'un bruit de fond extrêmement faible et d'une distinction efficace des différentes populations d'ARNm. Ces données suggèrent très fortement que l'induction de Arc est liée à une activité neuronale associée au traitement d'une information spécifique et n'est pas simplement induite en réponse au stress ou à la réalisation de la tâche comportementale (Guzowski et al., 2004, Guzowski et al., 2005). Dans l'hippocampe et le cortex, l'exploration d'un nouvel environnement active *arc* au sein des mêmes neurones qu'un autre IEG, *homer1A*, également impliqué dans la plasticité synaptique. Arc serait ainsi engagée dans un programme cellulaire spécifiquement activé par la nouveauté et pourrait agir en synergie avec d'autres protéines dans la réponse neuronale (Vazdarjanova et al., 2002).

Le couplage entre l'activation transcriptionnelle de *arc* et l'activité électro-physiologique des cellules n'est pas statique mais extrêmement plastique et fortement influencé par l'historique du neurone (Guzowski et al., 2001). En effet, une décharge neuronale récente peut

spécifiquement inhiber l'activation subséquente de *Arc*, à l'inverse d'une décharge neuronale plus ancienne. Ce couplage électro-transcriptionnel est proposé comme une forme de métaplasticité permettant de réguler la capacité du système à modifier ses synapses en limitant l'expression de gènes impliqués dans la plasticité.

b. *Arc* et l'apprentissage

L'expression de *Arc* est augmentée dans différentes tâches comportementales d'apprentissage. (Erreur ! Source du renvoi introuvable.) Une étude menée chez la souris a montré que l'apprentissage en lui-même induit une augmentation des ARNm *Arc* dans certaines aires corticales, l'hippocampe et l'amygdale (Montag-Sallaz and Montag, 2003). Cette étude est basée sur un paradigme d'apprentissage en un seul essai dans lequel les souris apprennent à fuir un environnement aversif lumineux en entrant dans un compartiment sombre. Les animaux exposés deux fois à ce protocole présentent une latence d'entrée dans le compartiment sombre qui est inférieure à celle des animaux exposés une seule fois à la tâche. L'expression des ARNm *Arc* est spécifiquement augmentée chez les animaux ayant été soumis deux fois au test, suggérant fortement que *Arc* est engagée dans le processus d'apprentissage en comparaison à l'exploration simple. En accord avec ces données, l'induction de *Arc* tend à diminuer chez des animaux surentraînés pour une tâche qui ont déjà acquis l'apprentissage (Kelly and Deadwyler, 2002). En effet, dans un apprentissage opérant de pression d'un levier, les ARNm *Arc* sont plus fortement augmentés dans l'hippocampe et le cortex des animaux qui ont nouvellement appris la tâche que chez les animaux déjà entraînés. De plus, l'expression de *Arc* est supérieure chez les animaux qui apprennent lentement que ceux qui acquièrent rapidement des capacités correctes pour la tâche. De la même manière, lors d'une tâche d'apprentissage spatial dans la piscine de Morris, les ARNm de *Arc* sont induits dans l'hippocampe de manière plus importante chez les animaux présentant de meilleures performances (Guzowski et al., 2001). Cette induction spécifique dans les phases précoces de l'apprentissage suggère que *Arc* est préférentiellement impliquée l'acquisition d'un nouveau comportement. Le décours de l'induction des messagers ainsi que leur persistance varie entre les différentes régions cérébrales activées (Kelly and Deadwyler, 2003). Ces dynamiques d'activation variables au sein des différentes régions pourraient refléter la contribution de ces structures dans l'acquisition et la consolidation de l'apprentissage. Les travaux de Kelly et Deadwyler ont montré que l'expression de *Arc* est

également augmentée dans le striatum pendant l'apprentissage de la tâche de pression d'un levier (Kelly and Deadwyler, 2003). Le striatum est une structure qui est fortement engagée dans les apprentissages moteurs ainsi que les apprentissages associatifs. Daberkov et ses collaborateurs ont utilisé un protocole d'apprentissage associatif dans un labyrinthe en « T » afin d'étudier plus spécifiquement la régulation de Arc au cours d'un apprentissage dépendant du striatum (Daberkow et al., 2007). Ce protocole est divisé en deux phases, une première correspondant à l'acquisition de la règle et une deuxième associée à l'inversion de la règle qui requiert la capacité à intégrer de nouvelles informations pour modifier la réponse comportementale. Les ARNm *Arc* sont augmentés spécifiquement dans la phase d'inversion de la règle et cette augmentation est corrélée avec la performance de l'animal et donc sa capacité à adapter sa réponse comportementale. Il est intéressant de noter que cette corrélation n'est pas retrouvée dans les régions latérales mais uniquement dans le striatum dorso-médian, ce qui est en accord avec l'engagement préférentiel de cette région dans la flexibilité comportementale (Ragozzino et al., 2002). L'induction de Arc semble ainsi être plus spécifiquement associée à l'acquisition de la nouvelle règle qu'au maintien des performances à exécuter une règle déjà connue.

c. Visualisation de l'expression de Arc

L'induction de Arc n'est pas le simple reflet d'un changement d'activité mais elle s'intègre dans un processus de traitement de l'information au sein d'une population neuronale engagée dans l'apprentissage. La visualisation de l'expression de Arc dans une région cérébrale offre la possibilité d'étudier la dynamique spatio-temporelle des populations neuronales activées au cours d'une tâche. Ceci implique cependant de pouvoir accéder à la dynamique de l'induction de Arc au cours de l'activité neuronale. Si la détection de Arc par immunofluorescence apporte des informations spatiales précises sur l'expression de la protéine à un temps donné, elle ne permet pas d'étudier finement les paramètres temporels de son induction. L'étude dynamique de l'expression de Arc a été permise par le développement de modèles murins transgéniques basé sur l'utilisation de systèmes rapporteurs qui permettent de visualiser l'activité du promoteur de Arc. Le laboratoire du Pr. Tonegawa a développé un modèle murin de type knock-in dans lequel la séquence codante de *arc* a été remplacée par la d2EGFP une forme déstabilisée de la GFP (Wang et al., 2006). Celle-ci possède une demi-vie de 2h qui permet un déroulement d'expression similaire à celui de Arc. Ce système rapporteur permet de

visualiser l'activité du promoteur de manière dynamique et d'imager une population de neurones activés au sein d'une région cérébrale. A l'état homozygote, l'expression de Arc est abolie et remplacée par celle de la GFP. La GFP étant exprimée sous le contrôle du promoteur de Arc, la détection des cellules exprimant la GFP permet de déterminer la population neuronale dans laquelle le promoteur de Arc a été activé. Bien que l'expression de Arc soit abolie dans l'ensemble des cellules du cerveau chez les souris homozygotes, la détection de la population neuronale exprimant la GFP permet d'analyser l'effet de la perte d'expression de Arc spécifiquement dans les cellules où elle *aurait dû* être exprimée. Chez les hétérozygotes, la GFP et Arc sont toutes les deux exprimées, et les auteurs établissent que l'expression de Arc est réduite de 20% par rapport aux animaux sauvages. L'utilisation de ce modèle a notamment permis de montrer que Arc est impliquée dans l'ajustement de la spécificité de réponse à l'orientation des stimuli visuels (Wang et al., 2006). La visualisation de l'expression de la GFP, *in vivo*, par microscopie biphotonique a montré que des stimuli horizontaux ou verticaux activent des ensembles neuronaux distincts au sein du cortex visuel. En comparant l'expression de la GFP chez les hétérozygotes et les homozygotes, les auteurs ont pu étudier l'effet de l'absence de Arc sur les populations neuronales recrutées dans la réponse aux stimuli visuels (Wang et al., 2006). Ce modèle a également été utilisé pour étudier l'implication de Arc dans la plasticité homéostatique au sein du cortex visuel (Gao et al., 2010). Plus récemment, l'utilisation de ce modèle transgénique a permis de visualiser les ensembles neuronaux recrutés dans le cortex moteur au cours de l'acquisition et de la consolidation d'un apprentissage moteur sur le rotarod (Cao et al., 2015). Cette étude a montré que les neurones dans lesquels Arc est activée au début de l'entraînement sont spécifiquement réactivés dans les jours suivants au fil de l'apprentissage moteur. L'apprentissage consolide ainsi le recrutement d'un ensemble neuronal spécifique et Arc joue un rôle clé dans ce mécanisme de plasticité. Il est intéressant de noter que l'intensité d'activation initiale du promoteur prédit sa probabilité de réactivation dans les jours suivants. Ceci démontre à nouveau le couplage très fin entre l'expression de Arc et l'activité et suggère que son niveau d'induction encode une information quant à l'implication du neurone au sein du réseau au cours de l'apprentissage. Dans ce modèle *knock-in* Arc-d2EGFP, l'expression de la GFP sous le contrôle du promoteur endogène de Arc représente un avantage considérable puisqu'elle permet que l'expression de la GFP reproduise de manière extrêmement fidèle celle de Arc. Ceci apporte, d'autre part, l'inconvénient que l'expression de la GFP reste relativement faible. De plus, dans ce modèle, la visualisation de l'activité du promoteur implique, soit, une perte d'expression totale de la protéine (KI homozygotes), soit, au

minimum une altération légère de son expression (KI hétérozygotes). Il ne permet donc pas de visualiser la dynamique d'induction de Arc dans un contexte où son expression endogène serait préservée. Ce type d'approche est, en revanche, permis par un autre modèle transgénique, les souris Arc::dVenus (Eguchi and Yamaguchi, 2009). Chez ces animaux, la protéine Venus est exprimée sous le contrôle du promoteur de Arc auquel a été ajouté un signal de polyadénylation qui permet d'augmenter le niveau d'expression du gène codant pour la protéine Venus. L'insertion de ce transgène de manière aléatoire dans le génome offre la possibilité de visualiser l'activité du promoteur de Arc sans altérer l'expression endogène de Arc (Eguchi and Yamaguchi, 2009). L'utilisation de ce modèle transgénique a permis d'analyser les modifications de la dynamique du patron d'expression de Arc dans le cortex visuel en réponse à des stimulations visuelle dans un modèle de la maladie d'Alzheimer (Rudinskiy et al., 2012). Cette étude montre que l'amplitude de l'expression de Arc dans un neurone en réponse à une stimulation visuelle est prédictive de la probabilité de réactivation de ce neurone lors de la réexposition à ce même stimulus. Cette association est fortement altérée chez des animaux modèles de la maladie d'Alzheimer révélant ainsi l'interférence des lésions induites par cette pathologie avec l'intégration des informations au sein des réseaux neuronaux (Rudinskiy et al., 2012). Plus récemment, ce modèle a permis de visualiser les ensembles neuronaux activés dans l'amygdale au cours d'un protocole de conditionnement par la peur via un stimulus auditif (Gouty-Colomer et al., 2015). Cette étude montre que les neurones exprimant Arc sont préférentiellement recrutés pour l'encodage de trace mnésique de la peur démontrant l'importance de l'induction de Arc dans le recrutement des ensembles neuronaux au cours de l'apprentissage.

Du point de vue fonctionnel, le développement de modèles d'invalidation génétique de Arc ont permis d'étudier l'effet de sa perte d'expression dans la mise en place de différentes formes de plasticité neuronale. A cet égard, le modèle Arc-d2EGFP, de type *knock-in*, présenté plus haut, est un modèle d'invalidation totale de la protéine dans lequel la séquence codante de Arc a été intégralement remplacée par celle de la GFP (Wang et al., 2006). Un autre modèle de type *knock-out* a également été développé dans le laboratoire du professeur Dietmar Klug, dans lequel la séquence codante de Arc a été intégralement supprimée du génome (Plath et al., 2006). Ces animaux présentent d'importants déficits d'apprentissage, en accord avec le rôle majeur de Arc dans la consolidation de la plasticité synaptique et de la mémoire (Plath et al., 2006).

Ces modèles génétiques présentent l'avantage d'être non invasifs et de conduire à une perte d'expression extrêmement fiable de la protéine. Cependant, ces modèles d'invalidation totale

de Arc dans le cerveau, dès la naissance, ne permettent pas d'étudier l'effet d'une perte d'expression de la protéine spécifiquement dans une région cérébrale ou à un temps donné. Ce type d'approche a été permis par l'utilisation de stratégies anti-sens couplés à des injections stéréotaxiques chez l'adulte. Ces études, basées sur l'infusion locale d'oligodésoxynucléotides (ODN), des séquences capables d'interférer avec la traduction de la protéine, offrent la possibilité d'inhiber localement et transitoirement l'expression de Arc dans une région cérébrale donnée (Ploski et al., 2008, Maddox and Schafe, 2011b).

Paradigme comportemental	Région cérébrale	ARNm ou Protéine	Référence
Environnement nouveau	- Cortex - Hippocampe	ARNm ARNm	Vazdarjanova et al, 2002 Guzowski, 1999
Tâche de pression d'un levier	- Cortex - Hippocampe - Striatum	ARNm	Kelly and Deadwyler, 2002, 2003
	- Cortex	Protéine	Kelly and Deadwyler, 2003
Piscine de Morris	- Hippocampe	ARNm	Guzowski et al, 2001
Labyrinthe en T	- Striatum dorso-médian	ARNm	Daberkov et al, 2007
Rotarod	- Cortex moteur	Protéine	Cao et al, 2015
Réponse à l'orientation des stimuli visuels	- Cortex visuel primaire	Protéine	Wang et al, 2006

Table 2 : Paradigmes comportementaux conduisant à une augmentation d'expression de Arc

4. Fonctions cellulaires de Arc et implications pour la plasticité

Dès sa première caractérisation en 1995, la localisation dendritique de Arc est apparue comme une de ses caractéristiques majeures et a soulevé de nombreuses questions quant aux fonctions synaptiques auxquelles elle pourrait prendre part. Les effets drastiques de la perte d'expression de Arc sur la consolidation de la plasticité synaptique dans de nombreux modèles sont également en faveur d'un rôle important de Arc à la synapse.

a. Arc et l'endocytose des récepteurs AMPA

La première description d'un rôle de Arc à la synapse a été apportée en 2006, dans le cadre d'une série de travaux publiés par le groupe de Paul Worley montrant l'implication de Arc dans la régulation du trafic des AMPAR entre la membrane plasmique et le cytoplasme.

Comme mentionné précédemment, un crible double hybride a permis d'établir que Arc interagit directement avec l'endophiline 3 et la dynamine 2, deux protéines impliquées dans la régulation de l'endocytose des vésicules recouvertes de clathrine (Chowdhury et al., 2006) (**Figure 19**). Dans des neurones d'hippocampe, Arc régule le trafic membranaire des AMPAR en interagissant directement avec ces deux partenaires de la machinerie d'endocytose. La régulation de l'expression des AMPAR de surface est extrêmement dynamique et joue un rôle central dans la plasticité neuronale (Bredt and Nicoll, 2003). La surexpression de Arc dans des neurones d'hippocampe augmente l'endocytose des AMPAR et diminue ainsi leur nombre à la surface (Chowdhury et al., 2006). Cette régulation est dépendante de l'interaction de Arc avec l'endophiline et la dynamine mais le mécanisme précis par lequel Arc affecte l'endocytose n'est pas connu à ce jour. A l'inverse, dans un modèle d'inactivation génétique de Arc, les neurones Arc $-/-$ présentent un taux anormalement élevé de AMPAR de surface.

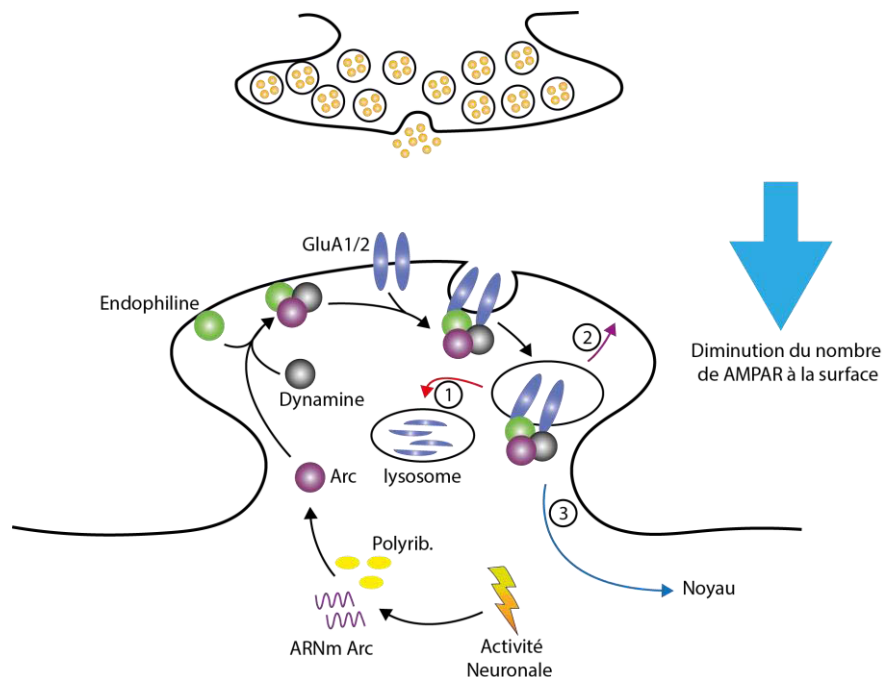


Figure 19 : Schéma illustratif du modèle proposé pour la régulation du trafic des AMPAR par la protéine Arc

L'ARNm de Arc est induit par l'activité neuronale et transporté vers les dendrites. La traduction locale de la protéine conduit à une augmentation de l'expression de la protéine au niveau des épines dendritiques. La protéine Arc recrute l'endophiline et la dynamine et constitue un complexe qui module la formation des endosomes et recrute sélectivement les AMPAR. Ces endosomes peuvent ensuite être (1) recyclés à la membrane, (2) adressés vers les lysosomes pour être dégradés ou envoyé au protéasome, (3) être adressés au noyau en tant que vésicules endosomales de signalisation ([Chowdhury et al., 2006](#)).

Une étude publiée en parallèle par le même groupe a reproduit ces données dans un modèle *ex-vivo*, de tranches organotypiques d'hippocampe ([Rial Verde et al., 2006](#)). Ce modèle a permis de montrer que cette diminution des AMPAR de surface induite par la surexpression de Arc est associée à une diminution des courants miniatures excitateurs (mEPSC, miniature excitatory postsynaptic currents) ainsi qu'une diminution des courants AMPA évoqués. Ce phénotype est spécifique des AMPAR, les transmissions glutamatergiques de type NMDA et GABAergiques n'étant pas affectées. En accord avec ces travaux, une troisième étude a montré que Arc, au travers de cette interaction avec la machinerie d'endocytose, est impliquée dans la régulation homéostatique des AMPAR ([Shepherd et al., 2006](#)). La plasticité homéostatique est un mécanisme de compensation par lequel le neurone ajuste son niveau de décharge global sans modifier la force relative de chaque synapse ([Turrigiano, 2008](#)). Les plasticités hebbiennes de type LTP ou LTD modifient individuellement les synapses d'un même neurone. Un excès de potentiation ou de dépression synaptique au sein d'un même neurone doit être évité car il pourrait aboutir à une saturation de l'activité électrique globale du neurone l'empêchant d'encoder de nouvelles informations. Ainsi la baisse ou la hausse chroniques de l'activité neuronale sont compensées par, respectivement, une augmentation ou une diminution du nombre de AMPAR de surface permettant de maintenir une excitabilité globale du neurone constante. L'induction de Arc par l'activité semble jouer un rôle clé dans ces mécanismes de plasticités homéostatiques. Une élévation anormale du niveau de Arc, par surexpression dans des neurones d'hippocampes, altère la capacité du neurone à augmenter le nombre de AMPAR de surface suite à la diminution chronique de l'activité. A l'inverse, en l'absence de Arc, dans des neurones KO, le niveau basal des AMPAR de surface est fortement augmenté et la réponse homéostatique à une baisse d'activité est abolie. Ainsi, Arc rapidement induite par l'activité pourrait participer à la réponse homéostatique du neurone en régulant la capacité de ce neurone à répondre à l'activité du réseau. Il est intéressant de noter que l'implication de Arc n'est pas spécifique d'une réponse homéostatique à la baisse ou la hausse de l'activité. Dans ce contexte à nouveau, le niveau d'expression de Arc, directement

corrélé à l'état d'activation du neurone, pourrait être porteur d'une information en lui-même et dicter l'engagement de Arc dans un type de régulation. Ces données affirment le rôle majeur de Arc dans le couplage extrêmement fin entre le niveau d'activité neuronale et la réponse du réseau (Shepherd et al., 2006, Peebles et al., 2010). Au travers de la régulation de l'endocytose des AMPAR, Arc est également impliqué dans la mise en place de la LTD. L'induction de la LTD par des stimulations électriques à basse fréquence ou par l'application d'un agoniste des mGluR requiert la synthèse rapide de protéine et l'endocytose des AMPAR (Waung et al., 2008). L'induction rapide de Arc dans les dendrites, en réponse à ce type de stimulations, est requise pour l'établissement de la LTD dans les neurones d'hippocampes (Park et al., 2008). L'inhibition de la synthèse dendritique de Arc bloque l'induction de la LTD ainsi que l'endocytose des récepteurs AMPAR nécessaire à la mise en place de cette dépression synaptique (Waung et al., 2008). L'induction rapide de Arc dans les dendrites est ainsi engagée dans des régulations locales de plasticités synaptiques.

L'ensemble de ces données indique que l'implication de Arc dans la régulation de l'efficacité synaptique n'est pas spécifique d'une forme de plasticité. Bien que l'homéostasie et la dépression synaptique ne soit pas mutuellement exclusives, l'engagement de Arc dans l'un ou l'autre de ces mécanismes est certainement soumis à régulation. Le contrôle extrêmement fin de l'expression de Arc suggère que son niveau d'induction pourrait varier en fonction des stimuli impliqués et conditionner sa fonction synaptique. La cinétique d'induction de la protéine pourrait également être critique. Dans les modèles de LTD, Arc est induite très rapidement à partir d'ARNm préexistants et ceci pourrait dicter son implication dans une forme locale de plasticité telle que la LTD. De la même manière la régulation de la durée d'expression de Arc à la synapse semble importante. En l'absence de Triad3A, qui est impliquée dans l'adressage de Arc au protéasome, l'accumulation de Arc conduit à une altération de l'efficacité synaptique en réponse à l'augmentation anormale des AMPAR de surface (Mabb et al., 2014). Dans le striatum, l'expression de Arc semble également réguler l'expression des AMPAR. L'inhibition locale de Arc par une stratégie anti-sens aboutit effectivement à la diminution du nombre des AMPAR de surface (Hearing et al., 2008).

L'ensemble de ces données indique que Arc joue un rôle important dans l'établissement de différentes formes de dépression synaptique à long-terme ainsi que dans l'ajustement de l'efficacité synaptique au cours de la plasticité homéostatique. Cette implication de Arc dans la régulation négative de l'efficacité des synapses glutamatergiques semble cependant en contradiction avec son induction au cours de la LTP qui tend à potentialiser l'activité de ces

synapses. Dans une étude publiée en 2012, le groupe du Dr Bito, propose un modèle qui permet de réconcilier ces différents rôles de Arc au sein du neurone (Okuno et al., 2012). Cette étude propose que Arc soit impliquée dans la dépression spécifique de certaines synapses, au sein d'un même neurone soumis à une potentialisation, au travers d'un mécanisme appelé « inverse synaptic tagging ». En effet, les auteurs montrent que la protéine Arc s'accumule préférentiellement au niveau des synapses qui ont été peu activées par rapport aux synapses qui ont été potentialisées au sein d'un neurone soumis à un protocole d'induction de la LTP. Ce phénomène dépend de l'expression de la CAMKII β qui se lie à Arc préférentiellement sous sa forme non liée à la calmoduline. Cette liaison à haute affinité entre Arc et la CAMKII β inactive contribuerait à capturer Arc spécifiquement au niveau de ses synapses les moins activées. Dans ces synapses faiblement activées, l'expression de Arc est corrélée avec une diminution de l'expression de surface des sous-unités GluA1 des récepteurs AMPA suggérant qu'elle est impliquée dans le maintien de ces synapses dans un état de faible activité. Arc contribuerait ainsi à un phénomène de « tagging » neuronal inverse dans lequel son expression limiterait la potentialisation des synapses les moins activées au cours d'une activité synaptique intense.

b. Arc et la plasticité structurelle

La plasticité synaptique repose également sur des modifications de la structure des synapses en réponse à l'activité neuronale. Les changements rapides de morphologie des épines dendritiques et leur stabilisation dans le temps sous-tendent la plasticité neuronale dans de nombreux modèles d'apprentissage (Rochefort and Konnerth, 2012). Le remodelage du cytosquelette d'actine est un évènement clé dans ces modifications de la structure des synapses (Dillon and Goda, 2005). Du fait de son lien privilégié avec le cytosquelette, il a rapidement été envisagé que Arc pourrait jouer un rôle dans les changements structurels induits par l'activité. La protéine Arc qui co-précipite avec l'actine et se localise dans le compartiment synaptique en réponse à l'activité neuronale pourrait être un candidat idéal (Lyford et al., 1995, Steward and Worley, 2001b).

Dans le gyrus denté de l'hippocampe, l'induction de la LTP est associée avec une augmentation durable de l'actine sous sa forme filamenteuse, la F-actine, et un accroissement du diamètre des épines dendritiques (Fukazawa et al., 2003). Ces changements s'accompagnent également d'une augmentation de la phosphorylation de la cofiline, une

protéine partenaire du cytosquelette qui, sous sa forme phosphorylée, promeut la polymérisation de l'actine (Sarmiere and Bamburg, 2004). Dans l'hippocampe, l'inhibition locale de Arc dans le gyrus denté bloque l'induction de la LTP en réponse à des stimulations à haute fréquence (Messaoudi et al., 2007). La perte de la LTP suite à l'inhibition de Arc s'accompagne d'une diminution du niveau de cofiline phosphorylée associée à une baisse de la polymérisation de l'actine. L'injection locale d'une drogue stabilisant la F-actine restaure l'induction de la LTP.

L'ensemble de ces données suggère très fortement que Arc favorise la LTP au travers de ses interactions avec le cytosquelette d'actine. Si le niveau d'expression de Arc influence le niveau de phosphorylation de la cofiline, les deux protéines n'interagissent pas directement et le mécanisme par lequel Arc pourrait exercer cette régulation reste inconnu à ce jour. Dans le noyau accumbens, la dynamique du cytosquelette d'actine et la régulation de la cofiline sont impliquées dans les adaptations comportementales induites par les drogues. L'injection aigüe de cocaïne chez le rat induit une augmentation de la polymérisation de l'actine associée à une augmentation de la phosphorylation de la cofiline et de sa kinase LIM-K (Toda et al., 2006). Il serait intéressant d'étudier si la protéine Arc induite dans ce contexte est impliquée dans ces modifications de la dynamique de l'actine. Dans un protocole d'auto-administration à la cocaïne, l'inhibition de la polymérisation de l'actine localement dans le noyau accumbens, augmente la réponse conditionnée des animaux lors de la réexposition au contexte (Toda et al., 2006). Etant donné que l'inhibition de Arc altère les capacités d'extinction dans ce même protocole (Hearing et al., 2010), il serait intéressant de voir si l'interaction de Arc avec la régulation de l'actine est impliquée dans ces réponses comportementales. Dans des neurones d'hippocampe, la surexpression de Arc augmente la densité d'épines dendritiques et modifie la proportion des différentes morphologies. Arc tend à accroître la proportion d'épines de type « thin », considérées comme plus plastiques au détriment des épines de type « stubby » qui sont plus stables (Peebles et al., 2010). Ces données suggèrent que l'induction de Arc augmenterait la capacité du neurone à former de nouvelles synapses en réponse à l'activité. Ceci est en accord avec l'implication de Arc dans les phases précoces de l'apprentissage et la formation de nouvelles mémoires proposée dans les études comportementales. Les auteurs ont également étudié l'effet de la perte d'expression de Arc sur la morphologie neuronale des souris knock-in Arc-d2EGFP (voir chapitre III-3.c). Les souris Arc $-/-$ présentent une réduction de la densité d'épines dendritiques dans le gyrus denté et la région CA1 de l'hippocampe. Ce phénotype est associé avec une plus forte excitabilité du réseau qui est en

accord avec le rôle de Arc dans la plasticité homéostatique (Peebles et al., 2010). De manière intéressante, cette étude révèle que la surexpression d'une forme mutante de Arc incapables d'interagir avec la machinerie d'endocytose n'affecte pas la morphologie des épines dendritiques. De plus, Arc régule spécifiquement l'endocytose des AMPAR dans les épines de type « thin ». Arc pourrait ainsi co-réguler en parallèle la morphologie des épines dendritiques et la force synaptique. (Peebles et al., 2010). Les auteurs proposent une hypothèse selon laquelle Arc agirait comme un intégrateur de ces deux mécanismes et compenserait la diminution de l'efficacité synaptique par une augmentation de la plasticité morphologique.

Les mécanismes cellulaires auxquels Arc participe sont variés et posent certaines questions quant au type de plasticité synaptique auquel elle contribue. L'augmentation d'expression de Arc dans des protocoles de LTP est associée au remodelage des épines dendritiques et son expression est requise pour l'expansion et la stabilisation des filaments d'actine qui sous-tendent la mise en place et le maintien de la potentiation à long terme. L'expression de Arc est également requise pour la mise en place de la LTD en favorisant l'endocytose des AMPAR qui est associée à la dépression synaptique. Parmi les facteurs déterminant, la cinétique et le niveau d'induction de la protéine dans les différents compartiments du neurone pourraient jouer un rôle clé. Dans le contexte de la LTD, l'induction de Arc par les mGluR est rapide et locale alors que son induction en réponse à la stimulation des récepteurs NMDA est dépendante de la transcription et donc plus tardive. Enfin, Arc est capable de contribuer à des réponses à long terme suite à des stimuli rapides dans le contexte de la mise en place de la LTP et la LTD mais elle est également sensible à des changements toniques durables de l'activité neuronale au travers de son rôle dans la plasticité homéostatique. Le niveau d'expression de Arc pourrait être crucial dans son engagement dans ces différentes formes de plasticité. Les oscillations de la protéine autour d'un niveau d'équilibre et la localisation de ces changements d'expression pourraient dicter sa fonction dans la plasticité synaptique (Shepherd and Bear, 2011).

c. Emergence d'un rôle nucléaire de Arc

Si la très grande majorité des études publiées au cours des vingt dernières années se sont intéressées aux fonctions synaptiques de Arc, il n'en demeure pas moins que la protéine est également présente dans le compartiment nucléaire. Dès 1995, les premières descriptions de

la protéine évoquaient sa présence au noyau mais l'originalité que représentait sa localisation dendritique en tant qu'IEG a longtemps suscité un intérêt plus vif. Les propriétés biochimiques de Arc rendent son interaction directe à l'ADN très peu probable et élimine ainsi l'hypothèse qu'elle agisse en tant que facteur de transcription. Quelques travaux ont apporté des éléments quant à ses possibles fonctions nucléaires mais son rôle précis dans ce compartiment reste peu étudié à ce jour.

Une étude basée sur un crible double-hybride a identifié la protéine Amida, une protéine nucléaire qui interagit directement avec Arc (Irie et al., 2000). Dans des cellules COS7, Arc se lie à Amida et cette liaison favorise le transport de Arc vers le compartiment nucléaire. Cette étude n'apporte en revanche aucunes données dans un modèle neuronal. Dans le noyau, Arc est associée aux promyelocytic leukemia nuclear bodies (PML-NBs) (Bloomer et al., 2007). Les PML-NBs sont des structures réparties de façon discrète dans le noyau et sont impliquées dans de nombreuses fonctions nucléaires telles que la régulation de la transcription, l'export des ARNm ou la formation de l'hétérochromatine (Bernardi and Pandolfi, 2007). Dans des cellules HEK 293T, Arc se lie aux PML-NBs au travers de son interaction avec une protéine du cytosquelette nucléaire, la spectrine β SpIV Σ 5. Cette interaction favorise la formation des PML-NBs et suggère que Arc pourrait également contribuer à la plasticité neuronale au travers de la régulation d'évènements nucléaires. Très récemment, une étude a montré dans des cultures de neurones d'hippocampe que l'interaction de Arc avec les PML-NBs est augmentée en réponse à l'activité neuronale et que ce mécanisme contribue à la diminution d'expression des sous-unités GluA1 des AMPAR (Korb et al., 2013). Cette étude a également apporté des éléments quant aux mécanismes impliqués dans le trafic de Arc entre le cytoplasme et le noyau. Le poids moléculaire de Arc est proche de la taille maximale permettant une diffusion passive au travers des pores nucléaires, il est donc difficile de déterminer si l'accumulation nucléaire de Arc relève d'un transport passif ou actif. Korb et ses collaborateurs montrent que l'expression nucléaire de Arc augmente en réponse à l'activité neuronale sous l'effet d'un transport actif au travers deux séquences de localisation nucléaire (NLS). Ils montrent également que Arc contient une séquence d'export du noyau (NES) et un domaine de rétention nucléaire (NRD). Ce travail apporte également des données *in vivo*, en montrant que l'expression de Arc est augmentée dans le noyau des neurones de l'hippocampe dans les 30 minutes qui suivent l'exploration d'un nouvel environnement. Une étude parue l'année dernière apporte de nouveaux éléments quant aux partenaires nucléaires de Arc et suggère qu'elle pourrait participer à des régulations épigénétiques au sein des neurones (Wee

et al., 2014). Dans des cultures de neurones corticaux, Arc interagit avec Tip60, une sous-unité d'un complexe d'histone acétyl-transférase et participe à la relocalisation de cette sous-unité à proximité des PML-NBs. La surexpression de Arc dans des neurones corticaux, entraîne une augmentation du niveau d'acétylation de la lysine 12 de des histones H4.

Ces données extrêmement récentes apportent de nombreux arguments en faveur d'un rôle potentiellement important de la protéine dans le compartiment nucléaire. Ces premiers éléments suggèrent fortement que Arc, en dépit d'une interaction directe avec l'ADN, pourrait tout de même être impliqué dans la régulation de l'expression des gènes. Arc se démarquerait ainsi encore une fois des IEG classiques au travers d'un mécanisme inattendu de régulation de la plasticité dépendante de l'expression génique. L'association aux spectrines nucléaires confirme à nouveau que le lien étroit qu'entretient Arc avec le cytosquelette, joue un rôle majeur dans sa capacité à moduler la plasticité neuronale. Le cytosquelette nucléaire aussi appelé matrice nucléaire est impliqué dans la régulation de l'expression des gènes (Percipalle and Visa, 2006, Visa and Percipalle, 2010). L'actine nucléaire est associée aux complexes de remodelage de la chromatine ainsi qu'à la machinerie transcriptionnelle et la régulation de sa dynamique au sein du noyau jouent un rôle clé dans la régulation de la transcription. Arc pourrait ainsi prendre part à la régulation de l'expression génique au travers d'interaction avec des protéines associées à la matrice nucléaire. La majorité des données présentées ici ont été obtenues dans des modèles *in vitro*, soit de lignées cellulaires soit de cultures primaires de neurones mais n'apportent pas d'éléments quant aux partenaires nucléaires de Arc *in vivo*.

5. Arc, plasticité synaptique et mémoire

La corrélation remarquable entre l'expression de Arc et l'apprentissage suggère fortement qu'elle est impliquée dans les adaptations neuronales à long terme qui sous-tendent la mémoire. La perte d'expression de Arc, qu'elle soit totale dans des modèles génétiques, ou locale via l'injection stéréotaxique de composés pharmacologiques, conduit à des altérations durables de la plasticité synaptique et de la consolidation de la mémoire. L'expression de Arc associée au traitement de l'information pendant l'apprentissage semble ainsi cruciale pour le stockage de l'information qui sous-tend la formation et la consolidation de la mémoire.

a. Rôle de Arc dans la plasticité à long terme

L'apprentissage et la mémoire reposent sur des modifications des synapses en réponse à l'activité neuronale. Cette capacité du neurone à modifier sa réponse en fonction des changements de son environnement se définit comme la plasticité synaptique. La mise en place de la mémoire comprend une première phase rapide qui est appelée mémoire à court terme et repose sur la modification de protéines préexistantes. La deuxième phase plus tardive appelée mémoire à long terme dépend de la transcription ainsi que de la synthèse de nouvelles protéines pour stabiliser les changements rapides. Ces modifications affectent l'efficacité synaptique soit en l'augmentant dans le cas de la LTP soit en la diminuant dans le cas de la LTD. Arc semble plutôt impliquée dans les phases tardives de la plasticité et donc plutôt dans la consolidation de la mémoire.

La perte d'expression de Arc chez des souris Arc *-/-* aboutit à une altération de la LTP tardive en réponse à des stimulations à haute fréquence de la voie perforante (Plath et al., 2006). L'inhibition locale de Arc par infusion d'un ODN dans l'hippocampe 1,5 h avant l'induction de la LTP conduit à une altération du maintien de la LTP sans affecter son induction (Guzowski et al., 2000). L'inhibition de Arc 2h après l'induction de la LTP aboutit également à une diminution du maintien de cette LTP. En revanche, l'inhibition transitoire de Arc rapidement, 15' après l'induction de la LTP, n'altère que transitoirement la LTP et ne bloque pas sa consolidation à long terme (Messaoudi et al., 2007). Ces travaux démontrent que la consolidation de la LTP requiert une traduction soutenue de Arc dans les deux heures suivant l'induction de la LTP.

Arc est aussi impliquée dans la diminution durable de l'efficacité synaptique au cours de la LTD. Les souris Arc *-/-* présentent une diminution de la durée et de l'intensité de la LTD induite par des stimulations à basse fréquence (Plath et al., 2006). Arc est également impliquée dans la LTD induite par la stimulation des récepteurs métabotropiques au glutamate (Waung et al., 2008). Il est intéressant de noter que cette forme de LTD ne repose pas sur l'activation transcriptionnelle de Arc mais sur une traduction rapide de la protéine dans les dendrites régulée, par la protéine FMRP et la *Calcium Calmoduline-dependent Kinase eEF2K* (Park et al., 2008).

b. Arc et la consolidation de la mémoire

Une étude menée dans un modèle murin d'invalidation génétique de Arc suggère que Arc serait préférentiellement impliquée dans la consolidation de la mémoire (Plath et al., 2006). Les souris Arc -/- ont des capacités de mémorisation à court terme similaires aux animaux sauvages mais présentent des déficits de la consolidation de la mémoire à long terme. L'exposition à un nouvel objet 10 minutes après la présentation d'un premier objet conduit à une exploration préférentielle du nouvel objet chez les animaux Arc -/- et sauvages. En revanche, si le nouvel objet est présenté 24h après le premier, les animaux sauvages continuent à explorer préférentiellement le nouvel objet alors que les KO explorent indifféremment les deux objets. Ces souris présentent des déficits de mémoire à long terme dans de nombreuses autres tâches d'apprentissages dépendantes ou indépendantes de l'hippocampe. L'incapacité de ces animaux à consolider la mémoire est observée dans les protocoles d'apprentissage spatial, de conditionnement de peur ainsi que dans un test d'aversion au goût. De la même manière, l'infusion locale d'un ODN anti-sens dans l'hippocampe perturbe la mémoire spatiale à long terme sans affecter la mémoire à court terme (Guzowski et al., 2000). Dans un apprentissage Pavlovien de conditionnement par la peur, l'inhibition locale de Arc dans l'amygdale abolit la consolidation de la mémoire de peur (Ploski et al., 2008). Arc est également impliquée dans les processus de reconsolidation de la mémoire dans un apprentissage Pavlovien de conditionnement par la peur (Maddox and Schafe, 2011a). L'expression de Arc est augmentée dans l'amygdale latérale lors de la réactivation de la mémoire de peur par réexposition à un stimulus auditif précédemment associé à un choc électrique. L'inhibition locale de Arc dans l'amygdale latérale abolit la réactivation de la mémoire de peur spécifiquement à long terme (24h) sans l'altérer à court terme (6h) indiquant que Arc est impliquée dans le processus de reconsolidation de cette mémoire.

6. Arc et les drogues d'abus

L'exposition aux drogues modifie durablement le fonctionnement neuronal au sein des régions cérébrales impliquées dans les comportements motivés et les apprentissages renforcés. En augmentant artificiellement et systématiquement les niveaux de dopamine dans ces structures, les drogues activent des voies de signalisation et des régulations géniques qui sous-tendent la mise en place d'une plasticité neuronale pathologique. L'induction de Arc en réponse à de nombreuses drogues suggère son implication dans les adaptations durables des circuits de récompense et la mise en place de l'addiction. Si Arc a été très largement étudiée dans le contexte d'apprentissages dépendants de l'hippocampe, son implication dans les apprentissages renforcés semble tout aussi déterminante, quoique non établie formellement à ce jour.

a. Régulation de l'expression de Arc par les drogues

La première démonstration que l'expression de Arc est affectée par les drogues a été apportée dès 1995, par une étude menée chez le rat (Fosnaugh et al., 1995). Les auteurs ont montré que les ARNm et la protéine sont induits dans l'ensemble du striatum en réponse à une injection unique de 20 mg/kg de cocaïne. Cette induction ne se limite pas au striatum, l'expression des ARNm est également augmentée dans le cortex préfrontal et dans une moindre mesure dans l'hippocampe (Fumagalli et al., 2006). L'administration répétée de cocaïne conduit également à une augmentation de l'expression de Arc dans ces mêmes régions (Freeman et al., 2002, Yuferov et al., 2003, Fumagalli et al., 2006). De la même manière, des traitements aigus ou chronique par l'amphétamine ou la méthamphétamine augmentent l'expression de Arc dans le striatum (Kodama et al., 1998, Tan et al., 2000, Fujiyama et al., 2003). Les psychostimulants ne sont cependant pas les seuls impliqués et l'expression de Arc est également modifiée par l'injection systémique de morphine (Marie-Claire et al., 2004, Lv et al., 2011). Les drogues antipsychotiques augmentent le niveau des ARNm de Arc dans le striatum alors qu'elle tend à diminuer leur expression dans le cortex préfrontal. (Fumagalli et al., 2009). L'administration chronique de ces traitements diminue l'expression de Arc dans ces deux régions. La consommation d'alcool affecte l'expression de Arc dans l'amygdale latérale et centrale sans altérer son niveau d'expression dans la région basolatérale. La consommation aigue d'alcool augmente les niveaux d'expression de la protéine et des messagers dans ces régions alors que l'abstinence après une prise prolongée tend à les diminuer (Pandey et al., 2008).

En termes de cinétique d'induction de Arc par la cocaïne, il existe une certaine discordance dans les données de la littérature. Les travaux de Fosnaugh et de ses collaborateurs montrent que l'ARNm de Arc est induit dès 15 minutes après une injection unique de cocaïne à 20 mg/kg et revient à son niveau basal après 2h (Fosnaugh et al., 1995). Une autre étude menée chez le rat montre une induction relativement faible mais significative des ARNm dans les 30 minutes suivant une injection de cocaïne à 5 mg/kg, avec un pic d'expression à 2h et un retour au niveau basal 6h. (Fumagalli et al., 2006). La divergence des données peut s'expliquer par la méthode utilisée, hybridation in situ pour la première étude et Northern-Blot pour la seconde mais également par les doses différentes de cocaïne qui ont été administrées. D'autre part, ces études proposent que l'induction de la protéine est augmentée de manière significative deux heures après l'injection de cocaïne or ce délai semble relativement long au vu de la rapidité de la régulation de Arc dans d'autres modèles. Si le western-Blot, utilisé dans ces deux études, fournit une information quantitative relativement précise, il n'apporte en revanche aucune donnée de localisation cellulaire et subcellulaire. Il est envisageable que des changements d'expression plus précoces aient lieu spécifiquement dans certaines populations neuronales ou compartiments cellulaires mais ne soient pas détectés par cette méthode. Ils pourraient en revanche être visualisés par des techniques immuno-histochimiques. En faveur de cette hypothèse, les données illustratives fournies indiquent que contrairement aux produits d'autres IEG induits par la cocaïne, l'expression de Arc n'est pas restreinte au soma mais elle est également détectée dans les prolongements dendritiques des neurones striataux. Ces observations, en accord avec ce qui est apparu ensuite comme l'une des caractéristiques fondamentales de Arc dans de nombreux modèles de plasticité, suggèrent que Arc pourrait être impliquée dans les modifications synaptiques durables induites par les drogues (Fosnaugh et al., 1995, Tan et al., 2000).

b. Mécanismes cellulaires de régulation de l'expression de Arc par les drogues d'abus

La dopamine, dont la concentration extracellulaire est augmentée par toutes les drogues d'abus, semble jouer un rôle clé dans la capacité de ces substances à modifier l'expression de Arc dans le cerveau. Chez le rat, la lésion spécifique des terminaisons dopaminergiques, par l'injection intra-striatale de 6-hydroxydopamine (6-OHDA), abolit l'expression de Arc dans la région lésée (Fosnaugh et al., 1995).

Dans le striatum, l'induction de Arc par la cocaïne est bloquée suite à l'administration du SCH23390, un antagoniste des D1R, elle n'est en revanche pas affectée par le prétraitement au raclopride, un antagoniste des D2R (Fosnaugh et al., 1995, Fumagalli et al., 2006). L'induction par l'amphétamine est également abolie en présence d'un inhibiteur des D1R (Beauvais et al., 2010). La stimulation des D1R est donc spécifiquement impliquée en amont de l'induction de Arc dans le striatum. Etant donnée la ségrégation des neurones striataux entre D1R-MS N et D2R-MSN, ces données suggèrent que Arc ne serait pas induite de façon homogène dans le striatum mais préférentiellement dans la sous-population de neurones qui expriment majoritairement les D1R. De manière extrêmement intéressante, l'expression basale de Arc est également soumise à une modulation par le système dopaminergique (Fumagalli et al., 2006). La stimulation des D2R, tout comme le blocage des D1R diminuent l'expression basale de Arc. A l'inverse un agoniste des D1R suffit en lui-même à induire des augmentations d'expression de Arc similaires à celles observées lors d'un traitement par la cocaïne. Arc n'est donc pas seulement induite par un mécanisme dépendant des D1R en réponse à des élévations de dopamine mais semble également osciller autour d'un niveau d'expression basal impliquant les D1R et D2R dans des conditions dites physiologiques. Ceci suggère que Arc ne serait pas seulement engagée dans une réponse du neurone à une stimulation chimique ponctuelle mais qu'elle pourrait également jouer un rôle dans la physiologie neuronale à des niveaux d'expressions plus bas.

S'il a été montré que le système glutamatergique est impliqué dans la régulation de Arc dans d'autres modèles, sa contribution dans l'induction de Arc dans le striatum et par les drogues reste partiellement connue. Dans un modèle *in vitro*, de cultures de neurones striataux, l'activation des mGluR5 intracellulaires augmente l'expression de Arc. Cette induction est restreinte au pool intracellulaire des récepteurs et n'est pas retrouvée après stimulation des mGluR5 de surface (Kumar et al., 2012). *In vivo*, l'activation transcriptionnelle de Arc dans le striatum par des stimulations des aires corticales motrices est abolie en présence d'un antagoniste des NMDAR (Miyachi et al., 2005).

Les données de la littérature sont également limitées concernant les voies de signalisation engagées dans la transduction du signal depuis la stimulation des récepteurs dopaminergiques jusqu'à l'activation transcriptionnelle de Arc dans les neurones striataux. Dans d'autres modèles de plasticité neuronale que l'exposition aux substances addictives, il existe un faisceau d'arguments en faveur d'un rôle majeur de la voie ERK dans la régulation de l'expression de Arc par les drogues. En réponse à la cocaïne, la voie ERK est activée en aval

des récepteurs D1 et glutamatergiques NMDA, et joue un rôle clé dans les adaptations moléculaires (régulations de gènes) cellulaires (plasticité synaptique) et comportementales à la drogue (Cahill et al., 2014b). L'induction de Arc a été montrée comme dépendante de la voie ERK dans de nombreux modèles *in vitro* mais aussi *in vivo* dans l'hippocampe (Waltereit et al., 2001). Dans le striatum, l'induction de *arc* par la cocaïne est partiellement diminuée par l'inhibition spécifique du facteur de transcription Elk-1, activé en aval de la phosphorylation de ERK (Besnard et al., 2011). En aval de ERK, l'activation de la kinase MSK-1, qui est impliquée dans l'induction de Arc en réponse au BDNF, joue aussi un rôle majeur dans les régulations géniques induites par la cocaïne (Brami-Cherrier et al., 2005). Ainsi, au travers de ses partenaires, la voie ERK activée par les drogues d'abus pourrait potentiellement contrôler la transcription de Arc. Dans l'hippocampe ERK régule également la traduction de Arc par la voie d'un partenaire cytoplasmique, la kinase Mnk1 (Panja et al., 2009). Un autre argument en faveur de l'implication de la voie ERK provient de l'étude d'un modèle murin d'invalidation de DARPP-32, une protéine impliquée dans l'activation de ERK par de nombreuses drogues (Valjent et al., 2005). Ces souris déficientes pour DARPP-32, présentent des altérations de la sensibilisation locomotrice ainsi qu'une perte de l'induction de Arc et c-Fos par la cocaïne (Zachariou et al., 2006).

Drogue	Traitement	ARNm ou Protéine	Structure cérébrale	Références
Cocaïne	Aigüe	ARNm	- Cortex - Striatum	Fosnaugh et al, 1995 ; Fumagalli et al, 2006
			- Hippocampe	Fumagalli et al, 2006
		Protéine	- Cortex - Striatum - Hippocampe	Fumagalli et al, 2006 Freeman et al, 2002
			- Striatum	Tan et al, 2000
	Chronique	ARNm	- Cortex préfrontal - Striatum	Fumagalli et al, 2006 Freeman et al, 2002 Yuferov et al, 2003
	Aigüe /Sensibilisation croisée au stress	ARNm	- Cortex préfrontal - Hypothalamus	Caffino et al, 2011
	Sevrage après une exposition développementale chronique		- Cortex préfrontal	Caffino et al, 2014
Meth-amphétamine	Aigüe & Chronique	ARNm	- Cortex - Striatum - Hippocampe	Kodama et al, 1998
	Aigüe	Protéine	- Striatum	Tan et al, 2000
Morphine	Chronique	ARNm	- Striatum	Marie-Claire et al, 2004
		Protéine	- Striatum	Lv et al, 2011
Nicotine	Réexposition au contexte		- Cortex préfrontal, cingulaire, sensoriel et sensorimoteur - Striatum - Amygdale	Schultz et al, 2005
Alcool	Aigüe	Protéine	- Amygdale	Pandey et al, 2008

Table 3 : Protocoles d'administration de drogues d'abus conduisant à une augmentation de l'expression de Arc

c. Arc et les réponses comportementales induites par les drogues

L'exposition aux drogues d'abus aboutit à des modifications des circuits neuronaux méso-limbiques qui peuvent se maintenir de façon extrêmement durable au-delà de la période de

consommation. Ces changements à long terme sous-tendent la mise en place des comportements addictifs et sont assimilés à une forme pathologique de mémoire suite au détournement des circuits de récompense par les drogues.

Les changements d'expression de Arc observés dans les circuits méso-limbiques, suggèrent très fortement qu'elle pourrait contribuer à la mise en place de la plasticité neuronale sous-tendant les adaptations comportementales à long terme induite par les drogues. Chez le rat, l'administration répétée de cocaïne induit une augmentation de l'expression de l'ARNm de Arc qui se maintient 72 heures dans le cortex préfrontal et jusqu'à 14 jours dans le striatum à l'inverse d'une injection unique pour laquelle les messagers reviennent au niveau basal après 6 heures (Fumagalli et al., 2006). L'expression de la protéine semble un peu plus transitoire mais persiste tout de même 72 heures dans le striatum au lieu de 2 heures après une injection unique. Le maintien de l'expression de Arc en réponse à une exposition répétée à la cocaïne pourrait être le reflet de son implication dans la mise en place d'adaptations neuronales durables au sein des réseaux cortico-striataux.

Un autre argument en faveur du rôle de Arc dans les adaptations durables induites par les drogues a été apporté par une étude menée chez le rat et basée sur un protocole de sensibilisation locomotrice à la cocaïne (Samaha et al., 2004). Dans cette étude, la cocaïne est injectée par voie intraveineuse afin d'étudier l'impact du débit auquel la dose est délivrée sur le développement de la sensibilisation. De manière intéressante, l'expression de Arc est spécifiquement augmentée en réponse au débit le plus rapide qui est aussi le seul à induire une réponse sensibilisée à la deuxième injection. Si elles ne permettent pas d'établir un lien causal, ces données démontrent tout de même l'existence d'une corrélation entre l'induction de Arc et une adaptation comportementale induite par la drogue.

Si Arc est régulée rapidement en réponse à l'administration de drogue, elle est également régulée par des stimuli précédemment associés à la drogue. Ainsi, de la même manière que pour l'exploration et la mémoire spatiale, l'induction de Arc n'est pas une simple conséquence de l'activation neuronale induite par la prise de drogue mais elle semble associée au traitement de l'information engagé dans les apprentissages associatifs. La capacité des drogues à attribuer une valence positive à un environnement initialement neutre est une composante majeure de l'addiction qui joue un rôle clé dans les phénomènes de manque et de rechute lors d'exposition au contexte. Dans les modèles animaux, la réexposition au contexte précédemment associé à la drogue suffit en lui-même à induire une activité locomotrice

assimilable à la recherche compulsive de drogue causée par le manque et stimulée par l'environnement. Chez le rat, la réexposition à un contexte précédemment associé à la nicotine induit une augmentation de l'expression des ARNm de Arc dans le cortex préfrontal, le striatum et l'amygdale (Schiltz et al., 2005). De la même manière, dans un protocole d'auto-administration à la cocaïne, la réexposition au contexte après une période d'abstinence augmente l'expression des ARNm de Arc dans le caudé-putamen et le striatum ventral, le cortex préfrontal et orbito-frontal (Hearing et al., 2008, Zavala et al., 2008). Dans ces études, Arc n'est pas induite en absence du levier, indice contextuel précédemment associé la drogue, démontrant que l'expression est bien liée à la présentation d'un stimulus renforcé. L'ensemble des ces résultats permet d'établir un lien fort entre l'expression de Arc et les apprentissages conditionnés par l'exposition aux drogues. Dans un protocole d'apprentissage conditionné consistant à presser un levier pour obtenir de la nourriture, nous avons vu précédemment que les ARNm de Arc sont spécifiquement induits au cours des phases précoces de l'apprentissage par comparaison à des animaux déjà entraînés (Kelly and Deadwyler, 2002, 2003).

L'induction de Arc dans ce contexte est majoritaire dans le cortex et le striatum, qui sont des régions cérébrales engagées dans les apprentissages associatifs. Au cours d'un apprentissage spatial, la régulation de Arc au sein des neurones de l'hippocampe est également corrélée avec le niveau de familiarité d'un environnement (Guzowski et al., 2001, Vazdarjanova et al., 2002). Dans le contexte de la prise de drogue, la nouveauté joue aussi un rôle important dans la régulation de Arc. L'effet de la prise d'amphétamine sur l'expression de Arc est significativement plus important si la drogue est administrée dans un environnement nouveau en comparaison avec la cage de l'animal (Klebaur et al., 2002). L'ensemble de ces données suggère très fortement que Arc pourrait jouer un rôle majeur dans les processus neuronaux qui sous-tendent l'association entre le contexte et la récompense.

Des données indiquent que Arc serait également impliquée dans le conditionnement aversif dans des régions cérébrales engagées dans ce type d'apprentissages. L'exposition à un environnement spécifique au cours d'un sevrage aux opiacés permet d'induire un conditionnement aversif fort lié au manque ressenti par l'animal. Dans ce type d'apprentissage conditionné, l'expression de Arc est augmentée majoritairement dans le noyau basolatéral de l'amygdale au cours du conditionnement mais aussi lors de la réexposition à l'environnement aversif (Lucas et al., 2008, Li et al., 2009).

L'ensemble de ces études permet d'établir des corrélations entre la régulation spatio-temporelle de Arc et les différentes phases des apprentissages renforcés mais n'apporte pas de lien causal entre son induction et les comportements modélisant l'addiction. Des études basées sur l'utilisation de stratégies anti-sens ont apporté des éléments de réponse concernant l'effet d'une perte d'expression de Arc dans les réponses aux drogues. Dans un protocole de préférence de place conditionnée par l'injection de morphine chez le rat, l'expression de Arc est augmentée dans le noyau accumbens pendant le conditionnement ainsi qu'en réponse à l'expression de la préférence de place (Lv et al., 2011). L'inhibition de l'expression de Arc par injection locale d'un oligo désoxynucléotide anti-sens dans le noyau accumbens au cours du conditionnement bloque l'acquisition de la préférence de place. La période d'abstinence qui suit une consommation chronique d'alcool est associée à une augmentation de l'anxiété chez le rongeur. Du point de vue moléculaire, l'abstinence est corrélée avec une diminution de l'expression du BDNF et de Arc dans l'amygdale. L'inhibition de Arc localement dans l'amygdale centrale entraîne une augmentation des comportements anxieux chez la souris et conduit à une consommation plus élevée d'alcool que chez les animaux contrôles (Pandey et al., 2008).

Les données concernant l'effet de la perte d'expression de Arc lors d'une exposition à la cocaïne restent peu nombreuses à ce jour. Une étude menée chez le rat a montré que l'inhibition de Arc localement dans le striatum dorsal n'altère pas le comportement d'auto-administration, ni la recherche active de drogue lors de la réexposition au contexte après une période d'abstinence (Hearing et al., 2008). Cependant, de manière très intéressante, cette étude révèle que l'inhibition de Arc diminue fortement l'extinction de la recherche de drogue lors de la réexposition au contexte précédemment associé à la drogue. Ces données corroborent très bien l'hypothèse selon laquelle Arc serait impliquée dans l'acquisition d'un nouvel apprentissage lors de l'extinction plutôt que dans la recherche compulsive de la drogue au cours de la réexposition à l'environnement conditionné. De plus le maintien du comportement d'auto-administration en l'absence de Arc n'est pas en faveur d'un rôle de la protéine dans les aspects purement motivationnels.

Au vu de l'ensemble de ces données, la caractéristique principale qui se détache de Arc relève principalement de son lien étroit avec la nouveauté. De l'activité exploratoire jusqu'à des apprentissages spatiaux ou conditionnés par des stimuli renforçants, Arc entretient un lien étroit avec le degré de nouveauté de l'environnement et pourrait être impliqué principalement dans l'association entre le contexte et les stimuli émotionnels qui s'y rapportent.

L'induction de Arc dans différents protocoles d'exposition aux drogues suggère qu'elle pourrait jouer un rôle central dans la plasticité neuronale qui sous-tend le développement de l'addiction. Le rôle de Arc spécifiquement dans la mise en place des adaptations comportementales à long terme induites par les drogues reste cependant inconnu à ce jour et les données concernant l'implication de cette protéine dans les adaptations neuronales au sein du striatum restent également très parcellaires.

OBJECTIFS

OBJECTIFS

L'addiction est une pathologie chronique, sous-tendue par des modifications persistantes des réseaux neuronaux impliqués dans les processus de récompense. Les adaptations cellulaires et moléculaires induites par les drogues au sein des neurones du système de récompense jouent un rôle central dans la mise en place des altérations comportementales à long terme observées dans l'addiction (Robison and Nestler, 2011). Cette étude s'inscrit dans une démarche de compréhension des processus cellulaires rapidement mis en jeu par les drogues et susceptibles d'impacter durablement le fonctionnement de ces réseaux ainsi que les comportements.

Dès la première exposition à la cocaïne, un programme transcriptionnel complexe est initié et contribue à la mise en place de changements durables du fonctionnement neuronal. Les IEG, rapidement induits en réponse à la cocaïne, jouent un rôle central dans l'orchestration des événements cellulaires qui sous-tendent ces adaptations durables. Ce travail est centré sur l'étude de l'IEG *arc*, un gène rapidement induit dans le striatum et le cortex en réponse à la cocaïne.

Arc est un acteur majeur dans les processus de plasticité neuronale (Shepherd and Bear, 2011). Cette protéine est induite dans de nombreux paradigmes comportementaux et son expression est étroitement corrélée avec les processus neuronaux engagés dans l'apprentissage et la mémoire. Arc est essentielle à la mise en place de multiples formes de plasticité synaptique et son inhibition conduit à d'importants déficits de consolidation de la mémoire. Si Arc a été très largement étudiée dans le contexte d'apprentissages dépendants de l'hippocampe, son implication dans les apprentissages renforcés pourrait être tout aussi déterminante quoique non établie formellement à ce jour. L'objectif de cette étude était de caractériser le profil et les modalités d'induction de Arc dans le striatum en réponse à la cocaïne et d'analyser son rôle dans les réponses moléculaires et comportementales induites par cette drogue.

Le premier volet de cette étude visait à analyser les mécanismes cellulaires impliqués dans l'induction de Arc par la cocaïne. Mon travail s'est centré plus particulièrement sur l'implication de la voie ERK qui joue un rôle majeur dans les régulations transcriptionnelles induites par la cocaïne. Dans la seconde partie de ce projet, je me suis attachée à définir le profil spatio-temporel de son induction au sein des neurones striataux avec un intérêt particulier pour sa localisation au sein du noyau. Cette étape semblait un prérequis important à l'élucidation des fonctions cellulaires auxquelles Arc pourrait prendre part suite à son

induction par la cocaïne. La troisième partie de ce projet visait à établir l'implication de Arc dans les réponses moléculaires et comportementales induites par la cocaïne. L'utilisation d'un modèle murin d'invalidation génétique de Arc, les souris knock-in Arc-d2EGFP ([Wang et al., 2006](#)), m'a permis d'étudier l'impact de la perte d'expression de Arc sur ces réponses.

RESULTATS

Activity-regulated cytoskeleton-associated protein accumulates in the nucleus and acts as a brake on chromatin remodeling and behavioral adaptations induced by cocaine

Salery Marine^{1,2,3}, Dos Santos Marc^{1,2,3}, Saint-Jour Estefani^{1,2,3}, Pagès Christiane^{1,2,3}, Kappes Vincent^{1,2,3}, Moumné Lara^{1,2,3}, Caboche Jocelyne^{1,2,3*}, Vanhoutte Peter^{1,2,3*}

¹ INSERM, UMR-S 1130, Neuroscience Paris Seine, Institute of Biology Paris Seine, F-75005, Paris, France

² CNRS, UMR 8246, Neuroscience Paris Seine, F-75005, Paris, France :

³ Sorbonne Universités, UPMC Université Paris 06, UM CR18, Neuroscience Paris Seine, F-75005, Paris, France

* equal contribution

1. Résumé de l'article

Arc est induite dans de nombreux paradigmes d'apprentissages et son expression est essentielle pour l'établissement de la plasticité synaptique à long terme et la consolidation de la mémoire. Cet IEG se caractérise par l'extrême finesse de sa régulation au cours des changements d'activité neuronale. L'expression de Arc est induite par diverses drogues d'abus au sein des circuits de récompense, notamment dans le striatum et le cortex en réponse à la cocaïne. Toutefois, le profil et les modalités de l'induction de Arc par cette drogue ainsi que son implication dans les adaptations moléculaires et comportementales qu'elle induit restent encore partiellement décrits.

Le profil spatio-temporel de Arc hautement contrôlé par l'activité neuronale en fait un marqueur d'activité extrêmement fiable au sein du neurone mais aussi à l'échelle d'une population cellulaire engagée dans des processus d'apprentissage ([Steward et al., 1998](#), [Guzowski et al., 1999](#)). Dans le striatum, le profil d'induction de Arc en réponse aux

changements d'activité neuronale induits par la cocaïne n'est pas précisément établi à ce jour. Dans la première partie de cette étude, nous avons analysé la cinétique d'induction de la protéine et des messagers dans le striatum de souris après une injection aigüe de cocaïne et nous avons pu montrer qu'ils sont induits rapidement et transitoirement en réponse à cette drogue. L'expression des ARNm, mesurée par PCR quantitative, est augmentée dans les 30 minutes suivant l'injection de la drogue avec une tendance nette à l'augmentation dès 15 minutes. L'analyse des protéines par immunohistochimie a révélé que l'expression Arc est augmentée, 30 minutes après l'injection de cocaïne, dans les régions ventrales (Noyau accumbens) et dorsales du striatum avec une prédominance dans le striatum dorso-médian antérieur. Cette induction dépend de la traduction de nouvelles protéines puisqu'elle est inhibée par un prétraitement avec l'anisomycine, un inhibiteur de la synthèse protéique.

Dans le striatum, l'activation de la voie ERK en aval des D1R et NMDAR est cruciale pour la mise en place du programme transcriptionnel complexe induit par cette drogue. Nous avons montré que la stimulation des D1R et NMDAR ainsi que l'activation de la voie ERK sont requis pour l'induction de Arc en réponse à la cocaïne.

Suite à son induction, la localisation subcellulaire de Arc est finement contrôlée par l'activité neuronale, son accumulation rapide dans le compartiment dendritique est notamment une de ses propriétés remarquable ([Steward and Worley, 2001a](#), [Bramham, 2008](#)). Dans les neurones striataux, nous montrons que l'expression de Arc est augmentée dans le compartiment dendritique où elle est présente dans les prolongements et les épines dendritiques. De manière plus inattendue, notre étude révèle une forte accumulation de la protéine dans le noyau des MSN dès 30 minutes suivant l'injection de cocaïne. Dans le compartiment nucléaire, Arc se localise exclusivement en dehors des régions de chromatine dense qui sont caractérisées par un marquage plus intense par le Hoechst. Ces régions du noyau, où la chromatine fortement compactée est moins accessible à la machinerie transcriptionnelle, sont associées à une activité transcriptionnelle moins intense. Arc est exclue de ces régions et se localise dans des zones de chromatine plus relâchée, associée à une transcription active. Dans le noyau des MSN, l'augmentation de la phosphorylation des histones H3 est un marqueur de remodelage de la chromatine induit en aval de ERK qui est associé à une augmentation de l'activité transcriptionnelle. L'analyse à haute résolution en 3 dimensions de la distribution des deux protéines a montré que Arc est fortement colocalisée avec les histones H3 phosphorylée.

Dans un modèle *in vitro* de cultures primaires de neurones striataux, la surexpression de Arc entraîne une diminution de la phosphorylation des histones H3 induite par le glutamate. L'activité de la kinase MSK-1, impliquée dans cette phosphorylation, est également diminuée. En revanche, l'activation et la translocation nucléaire de la ERK en amont sont préservées.

Dans la dernière partie de ce projet, nous avons étudié l'effet de la perte d'expression de Arc sur les réponses à la cocaïne au travers de l'utilisation d'un modèle murin d'invalidation génétique de *arc*. Cette lignée transgénique développée dans le laboratoire du professeur Tonegawa, est un modèle de type « knock-in », dans lequel la séquence codante du gène *arc* a été remplacée par la séquence codante de la GFP. A l'état homozygote, l'expression de Arc est totalement abolie et la GFP, exprimée sous le contrôle du promoteur de *arc*. Chez les animaux sauvages, l'expression de Arc est intégralement préservée et la GFP n'est pas présente dans le génome. A l'état hétérozygote, les séquences codantes des gènes *arc* et *gfp* sont présentes en un allèle chacune et les protéines Arc et GFP sont exprimées simultanément.

Nos données indiquant un lien entre Arc et des partenaires de remodelage de la chromatine, nous avons souhaité étudier l'effet de la perte d'expression de Arc sur la structure de la chromatine et l'activité transcriptionnelle. Chez les animaux transgéniques, la GFP exprimée sous le contrôle du promoteur de *arc* peut servir de rapporteur de l'activité de ce promoteur. Nous avons ainsi pu comparer les réponses moléculaires dans les cellules positives pour Arc chez les sauvages et les comparer avec les réponses dans les cellules positives pour la GFP chez les transgéniques. Dans ces deux types de population cellulaire, le promoteur de *arc* a répondu à l'activité mais dans un cas la protéine est exprimée alors qu'elle est absente chez les transgéniques. Cette approche permet de mesurer l'effet de la perte d'expression de la protéine dans une cellule qui « aurait dû » exprimer Arc. Nous avons montré que la surface occupée par l'hétérochromatine au sein du noyau est diminuée en réponse à la cocaïne chez les animaux sauvages. Ceci indique que la drogue promeut la décompaction de la chromatine, en accord avec l'activation massive de la transcription en réponse à la cocaïne. Chez les animaux transgéniques, l'hétérochromatine est également fortement diminuée, et ce, aussi bien chez bien chez souris utilisées comme contrôle que celles traitées à la cocaïne, indiquant que la perte d'expression de Arc modifie la structure de la chromatine et favorise son relâchement. Ce phénomène est associé à une augmentation constitutive chez les animaux transgéniques de l'activité de la RNA Pol-II, mesurée par l'analyse du niveau de phosphorylation de son domaine C-terminal. Comme attendu, cette phosphorylation est également augmentée chez les animaux sauvages en réponse à la cocaïne.

Nous avons finalement analysé l'impact de la perte d'expression de Arc sur les réponses comportementales à la cocaïne. Nous avons montré que les animaux transgéniques présentent une activité locomotrice basale inférieure aux animaux sauvages alors qu'elle n'est pas modifiée chez les animaux hétérozygotes. Nous montrons que la perte d'expression de Arc est associée à une augmentation de la sensibilisation locomotrice induite par la cocaïne dans un protocole en deux injections. Pour des doses élevées de cocaïne (15 mg/kg), les animaux transgéniques présentent une activité locomotrice plus importante en réponse à la première injection et une sensibilisation locomotrice augmentée à la deuxième injection. L'absence de Arc aurait donc pour conséquence de mimer certains des effets induits dans le compartiment nucléaire par une injection unique de cocaïne. Nous avons donc émis l'hypothèse que l'absence de Arc pourrait prédisposer les animaux transgéniques à répondre de manière exacerbée à plusieurs injections. En accord avec cette hypothèse, nous montrons que les animaux transgéniques présentent une sensibilisation locomotrice nette en réponse à une dose faible de cocaïne (7,5 mg/kg), dose qui n'induit pas de sensibilisation locomotrice chez les sauvages.

2. Article

Activity-regulated cytoskeleton-associated protein accumulates in the nucleus and acts as a brake on chromatin remodeling and behavioral adaptations induced by cocaine

Salery Marine^{1,2,3}, Dos Santos Marc^{1,2,3}, Saint-Jour Estefani^{1,2,3}, Pagès Christiane^{1,2,3}, Kappes Vincent^{1,2,3}, Moumné Lara^{1,2,3}, Caboche Jocelyne^{1,2,3*}, Vanhoutte Peter^{1,2,3*}

¹ INSERM, UMR-S 1130, Neuroscience Paris Seine, Institute of Biology Paris Seine, F-75005,

Paris, France

² CNRS, UMR 8246, Neuroscience Paris Seine, F-75005, Paris, France

³ Sorbonne Universités, UPMC Université Paris 06, UM CR18, Neuroscience Paris Seine, F-75005, Paris, France

* equal contribution

ABSTRACT

Background: Drug addiction relies on persistent alterations of neuronal properties involving gene regulation. The activity-regulated cytoskeleton-associated (Arc) protein is rapidly and robustly induced by changes in neuronal activity. It is localized to both active synapses and nuclei and required for virtually all forms of long-term plasticity and memory consolidation. However, its role in cocaine-induced molecular and behavioral adaptations remains to be fully established.

Methods: Pharmacological, biochemical, immunohistochemical studies were performed from wild-type or genetically modified mice deficient for *Arc* exposed to cocaine. Mice were also subjected to behavioral experiments. Live imaging; transfections and immunocytochemistry were also performed on cultured striatal neurons.

Results: *Arc* mRNA and proteins are rapidly induced by cocaine in the striatum via an ERK-dependent *de novo* protein synthesis. Surprisingly, although detected in dendrites, *Arc* dramatically accumulates in the nucleus in response to acute cocaine. Its expression appeared to be restricted to a zone of transcription where *Arc* colocalizes with phosphorylated histone H3 (pH3). *In vitro*, *Arc* overexpression impacts on chromatin remodeling by inhibiting pH3. *In vivo*, mice deficient for *Arc* showed a decrease of heterochromatin domains associated to a high RNA-Pol II activity. These mice presented an exacerbated psychomotor sensitization to low doses of cocaine.

Conclusions: The rapid induction of *Arc* downstream from ERK and its nuclear accumulation induced by acute cocaine favors the compaction of chromatin and dampens RNA-Pol II activity. *Arc* induction in the striatum thus acts as a brake on chromatin remodeling and exerts a negative retro-control on molecular and behavioral responses to cocaine.

INTRODUCTION

Addiction is a compulsive pattern of drug-seeking/drug-taking behavior with recurrent episodes of abstinence and relapse, and a loss of control despite negative consequences. The neurobiology of motivated behavior involves numerous intricate neuronal circuits and neurotransmitters which dysregulations are implicated in the pathophysiology of addictions (1). Therefore, a better understanding of cellular and molecular adaptations taking place in these circuits is needed to improve our knowledge on the neurobiological correlates of addiction and for the development of future treatments. In animal models, drug-induced long-term behavioral alterations require changes in transcription and translation (2). Early changes in gene expression occurring soon after cocaine exposure are believed to set the stage for long-lasting modifications of neuronal activity and behavior. In this way, a particular attention has been paid on the rapidly induced immediate early genes (IEGs) that can be divided into either genes encoding transcription factors, which indirectly alter the expression of target genes, or genes that encode effector proteins acting directly on cellular functions and homeostasis.

Activity-regulated cytoskeleton-associated protein (Arc) is an IEG that belongs to the category of effector proteins and displays low basal levels of expression within neurons (3). It is highly regulated by changes in neuronal activity, including high-frequency stimulation of the perforant path or electroconvulsive shock (4-6), thus positioning Arc as a reliable index of activity-dependent synaptic modifications. These stimulations induce Arc transcription but also regulate the localization of *Arc* mRNA within dendrites as well as the translation and degradation of the protein (7). Because of its characteristic dendritic localization, where it controls glutamate AMPA receptor (AMPA) trafficking, synaptic strength, and long-term neuronal plasticity (8-11), much attention has been paid on Arc's functions at synapses.

However, Arc protein can be detected in the nucleus (12), with very few data concerning its role in this sub-cellular compartment. Recently, Arc nuclear expression was found to participate to the homeostatic response to prolonged increased neuronal activity by enhancing the expression of the promyelocytic leukemia (PML) protein, which decreases the transcription of the GluA1 subunit of AMPAR and participates to the downscaling of synaptic strength (13).

Arc expression is also upregulated in cortical and striatal regions by cocaine and cocaine-associated stimuli (14-18). In rats trained to self-administer cocaine, the local knockdown of Arc within the dorsolateral part of the striatum did not affect cocaine-seeking behavior after a period of abstinence but drastically altered the extinction of this behavior (19). Altogether these data suggest that striatal Arc may be an effector protein of neuronal adaptation induced by cocaine.

Herein, we characterized the kinetics and signaling pathways involved in Arc mRNA and protein expression by cocaine in medium-sized spiny neurons (MSN) of the striatum. We studied the dendritic versus nuclear localization of Arc protein in response to cocaine and observed a strong accumulation of Arc in the nucleus, at the strict vicinity of the nucleosomal machinery. In the nucleus, Arc expression was restricted to active zones of transcription where it co-localized with the phosphorylated form of histone H3, a marker of cocaine-induced chromatin remodeling (20). In cultured MSN *in vitro*, Arc overexpression reduced histone H3 phosphorylation, indicating that Arc acts as a brake on chromatin remodeling. Consistently, *Arc*-deficient mice present drastic changes in chromatin organization characterized by a decrease of heterochromatin domains, which was associated to an increased transcriptional activity of the RNA polymerase II (RNA-Pol II). These mice displayed an increased psychomotor sensitization to low doses of cocaine. We conclude that the rapid and transient induction of Arc within the nucleus contribute to the dynamic of

Salery et al.

chromatin remodeling, and control molecular and behavioral responses to cocaine. This new facet of Arc's functions is likely to contribute to its homeostatic role within neurons.

Salery et al.

METHODS AND MATERIALS

See supplementary methods and materials for details.

RESULTS

Kinetics and pharmacological profile of cocaine-induced Arc mRNA and protein synthesis in the striatum

Arc is an IEG that is rapidly activated by changes in neuronal activity in various brain regions, where it plays a central role in synaptic plasticity and memory consolidation (21). Acute exposure to cocaine also increases the levels of *Arc* mRNA and proteins in the rat striatum (14), but the functions of this IEG in the development of long-lasting alterations induced by drugs of abuse remains largely unknown. In order to get further insight into the role of Arc in cocaine-induced cellular and molecular adaptations, we established a precise time-window of *Arc* mRNA and protein induction by acute cocaine in mice. At 20 mg/kg (**Fig. 1A**), cocaine trends to increase *Arc* mRNA in the whole striatum as soon as 15 minutes post injection. This induction was robust and reached a significant three-fold increase from 30 to 60 minutes and returned to basal levels 2 hours after drug treatment (**Fig. 1A**). At 10 mg/kg of cocaine, an increase of *Arc* mRNA was also detectable albeit it was less robust and more transient (**Fig. S1A**). We then studied the expression of Arc proteins and found it was induced by cocaine in the whole rostro-caudal extension of the dorsal and ventral parts of the striatum (**Fig. S1B, Fig. 1B**). Quantifications of Arc-immunoreactive cells showed a transient increase in the dorso-medial (DM) and ventral (Nucleus Accumbens shell, NAcc) striatum, which was observed as soon as 30 minutes, then reached a plateau at 60 minutes, and returned to basal levels within 2 hours (**Fig. 1D**). Similar profiles were found at 10mg/kg (**Fig. S1C**).

The signaling pathways that regulate Arc expression in the striatum in response to cocaine remain to be established. A protein synthesis inhibitor (Anisomycin) was first administered 30 minutes prior to cocaine and mice sacrificed 1 hour later. Cocaine-induced Arc-expression was abolished by anisomycin in both the DM and NAcc (**Fig. 1E**). Of note, Arc immunoreactivity was also strongly reduced by anisomycin in saline-treated mice, which is consistent with the short half-life of this IEG. By increasing dopamine levels in the striatum,

cocaine is known to regulate cellular and molecular events in MSN expressing D1 receptors (D1R-MSN), and signaling crosstalk between D1R and glutamate receptors of NMDA subtypes (NMDAR) are critical for cocaine-induced long-lasting plasticity (22-23). Consistently, Arc induction by cocaine was blunted by NMDAR (MK801) or D1R (SCH23390) antagonists (**Fig. 1F**). Furthermore, c-Fos, an IEG which expression is restricted to D1R-MSN upon acute cocaine, perfectly co-localized with Arc (**Fig. S1G**). A major signaling pathway involved in long-term cellular adaptations mediated by cocaine is the Extracellular signal-Regulated Kinase (ERK) cascade, which behaves as a key integrator of D1R and NMDAR signaling (24-25). The administration of SL 327, a selective inhibitor of MEK (the kinase upstream from ERK), prior to cocaine completely abolished the induction of Arc mRNA and proteins (**Fig. 1G**). Altogether, these data show that Arc mRNA and proteins are rapidly and transiently induced by acute cocaine in the ventral and dorsal parts of the striatum via an ERK-dependent *de novo* protein synthesis downstream from both D1R and NMDAR.

Cocaine preferentially increases Arc expression in the nucleus of striatal neurons

There are accumulating evidences that Arc induction in dendrites plays a key role in neuronal plasticity (7). However, whether it is induced locally by cocaine remained unknown. Confocal imaging was performed to precisely determine the sub-cellular localization of Arc proteins induced 1 hour after cocaine. DyeI labeling of the dendritic shaft and spines (26) coupled to Arc staining convincingly showed that Arc-positive puncta were present in the dendritic shaft and spines (**Fig. 2A**). Nevertheless, a strong immunolabeling was also visible in the nucleus of striatal neurons (**Fig. 2B**). The impact of cocaine on Arc cellular distribution was assessed at different time points after cocaine administration by analyzing its expression within the nucleus and outside of it, in the soma and dendritic tree (referred to as Neuropile staining (see

Fig. 2C-G). A computer-based routine was set up on confocal images of Arc labeling from slices in which nuclei were counterstained with Hoechst. The Arc signal that co-localized with Hoechst was subtracted from total Arc staining to give access to the “Neuropile,” staining (**Fig. 2C** “- nuclei”). By contrast, the signal co-localized with Hoechst allowed the determination of Arc-positive nuclei (“nuclei”; **Fig. 2C**). In the DM, total Arc and the immunoreactivity in the neuropile significantly increased 60 minutes post-cocaine administration, and returned to basal levels (**Fig. 2D-E**). Interestingly, cocaine appeared to have a stronger effect on the nuclear expression of Arc, which was increased as soon as 30 minutes post-cocaine and further augmented at 60 minutes to return to basal levels within 2 hours (**Fig. 2F**). Of interest, in the NAcc, cocaine only increased the nuclear pool of Arc with fewer Arc positive cells than in the DM (around 10%) (**Fig. S2A-C**). These data indicate that Arc proteins accumulate earlier and preferentially in the nucleus when compared to soma and neuropile in response to acute cocaine

Arc is localized at the vicinity of active chromatin markers in the nucleus

DNA is highly packed into chromatin, a DNA/protein complex that comprises histones and components of the transcriptional machinery. For transcription to occur, chromatin must be loosened up via processes involving post-translational modifications of histones. The inactive zone of transcription, also called heterochromatin, is characterized by a bright Hoechst staining (**Fig. 3A**). At high magnification, a perfect exclusion of Arc from heterochromatin was clearly visible (**Fig. 3A**), indicating that Arc is likely localized in active zones of transcription. To address this, we used Ser10-Histone H3 phosphorylation (pH3) labeling, a marker of active chromatin remodeling and cocaine-induced gene regulation in MSN. PH3 is rapidly (30 minutes) activated downstream ERK and mitogen and stress-activated kinase 1 (MSK-1) in response to cocaine (20). The distribution of pH3 and Arc puncta was analyzed in

3D within the nuclei 30 minutes after cocaine. At this time point, Arc and pH3 strongly colocalized (**Fig. 3B-D**), with 70% of Arc-positive puncta colocalized with pH3 (**Fig. 3B-C**). At the cellular level, the kinetics of these two markers showed that both signals are detectable in the same cells at 30 minutes after cocaine. At 60 minutes pH3 was decreased meanwhile Arc was maintained, resulting in drastic decrease of pH3-Arc colocalization (**Fig. 3D**).

Overexpression of Arc alters histone H3, but not ERK1/2, phosphorylation in vitro.

We observed that cocaine-induced Arc accumulation in the nucleus preferentially occurs within active zones of chromatin remodeling where histones H3 are phosphorylated. The occurrence of Arc induction correlated spatio-temporally with pH3, but lasted longer (**Fig. 3D**). We therefore tested whether the nuclear accumulation of Arc could regulate pH3. To address this, we used cultured MSN treated with glutamate, which triggers the activation and nuclear translocation of ERK1/2 and downstream activation of pH3 (27-28). The impact of Arc overexpression was studied by transient transfections of a cDNA encoding Arc fused to GFP and live imaging was performed after glutamate application. Under basal conditions, the GFP-Arc signal was detectable in dendrites and was higher in the soma and the nucleus (**Fig. 4A**; left panel). Incubation with 10 μ M of glutamate triggered a progressive accumulation of GFP-Arc in the soma and then in the nucleus, thus rendering this *in vitro* model ideally suited to evaluate the potential impact of Arc on glutamate-mediated histone H3 phosphorylation. In response to glutamate, MSN transfected with GFP showed increase of pH3 labeling, as previously shown (28) (**Fig. 4B , upper panel; 4C**). This response was strongly inhibited in neurons expressing GFP-Arc (**Fig. 4B, lower panel; 4C**), thus indicating that Arc overexpression alters chromatin remodeling via the inhibition of pH3. Because this response could be due to a attenuation of glutamate-induced neuronal activity, along with inhibition of ERK activity and nuclear translocation, we investigated phosphorylated ERK in

MSN transfected with GFP or Arc-GFP. No modification of either ERK1/2 activity or its nuclear translocation was found in the presence of GFP-Arc (**Fig. 4D-E**).

Deletion of Arc alters heterochromatin domains in vivo.

Our results support that Arc is a potential modulator of chromatin remodeling. To test this *in vivo*, we took advantage of the GFP-Arc knock-in mice in which the coding sequence of Arc has been replaced by the GFP gene (29). In homozygous knock-in (KI) mice, Arc is not expressed and GFP serves as a reporter of Arc promoter's activity. To validate the use of this mouse line in our model, GFP-Arc mice of the three genotypes were treated with saline or cocaine and Arc or GFP labeling was performed 1 hour post-injection (**Suppl. Fig. 3**). Wt mice presented a strong induction of Arc in the DM 1 hour after cocaine and GFP was not detected whereas the mirror image was observed in the KI mice in which cocaine increased GFP expression in the absence of Arc. To study the role of Arc on cocaine-induced chromatin remodeling, we analyzed heterochromatin domains, which correspond to puncta that are highly stained with Hoechst (30-31), within the nuclei of GFP-Arc mice 1 hour after saline or cocaine injections (**Fig 5A-E**). In Wt mice, cocaine reduced the number of Hoechst-positive puncta (**Fig. 5B-C**) together with the area occupied by heterochromatin per nuclei (**Fig. 5D-E**), thus illustrating that cocaine is associated with DNA decompaction. KI mice showed a drastic reduction of the number and size of heterochromatin domains regardless of cocaine exposure, which was correlated to a higher number of cells highly stained with pH3 (not shown). The removal of Arc thus alters the organization of chromatin to reduce DNA compaction, which is a state that favors transcription. Since RNA polymerase II (RNA-Pol II) is a central player of the transcriptional machinery, and because chromatin organization can influence its activity (32), we evaluated the role of Arc on the activity of RNA-Pol II. This was done by measuring the phosphorylation levels RNA-Pol II on its c-terminal domain (33)

in Wt and KI mice treated or not with cocaine. Cocaine triggered a strong increase of RNA-Pol II phosphorylation in Wt mice (**Fig. 5F**), which is consistent with the wide spectrum of activity-dependent gene induction by cocaine (2). By contrast, KI mice showed a constitutively high level of RNA-Pol II activity with no further increase detectable upon cocaine exposure (**Fig. 5F**). Altogether, this indicates that Arc has an unexpected broad inhibitory effect on chromatin remodeling and RNA Pol II-mediated transcription.

Arc deficiency augments behavioral sensitization to low doses of cocaine.

Chromatin remodeling is critical for behavior alterations induced by drugs of abuse (2). Hence, we studied the role of Arc in the development of long-lasting adaptations at the behavioral level in GFP-Arc mice. We first measured the basal locomotor activity of these mice. Wt and GFP-Arc heterozygous mice had a similar spontaneous locomotion, whereas the GFP-Arc homozygous KI mice displayed a significantly lower locomotor activity (**Fig. 6A-B**). GFP-Arc mice of the three genotypes were then subjected to a protocol of psychomotor sensitization induced by two injections of cocaine with a one-week interval (23; **Fig. 6C**). After the first administration of cocaine (15 mg/kg), cocaine increased locomotor response similarly between Wt and heterozygous, whereas homozygous KI mice showed a higher response (**Fig. 6D**). After the second injection, all groups of mice showed a behavioral sensitization that was similar between Wt and heterozygous mice, but significantly higher in homozygous mice (**Fig. 6D**). This demonstrated that a complete deficiency of Arc expression triggers a hypersensitivity to cocaine. We reasoned that lower doses of cocaine might unmask severe differences linked to the absence of Arc. When using 7.5 mg/kg of cocaine, we could not detect any difference between the three genotypes in the acute locomotor response to cocaine recorded after the first injection (**Fig. 6E**). Using this low dose of cocaine, Wt mice did not sensitize to cocaine whereas heterozygous and KI mice displayed a clear

Salery et al.

psychomotor sensitization, thus demonstrating that Arc efficiency precipitates behavioral alterations induced by cocaine.

DISCUSSION

The present work demonstrates a nuclear accumulation of Arc in MSN in response to cocaine. Arc was restricted to active zones of transcription where it co-localized with pH3. *In vitro*, Arc overexpression in cultured MSN altered glutamate-induced pH3, while sparing activation of ERK. *In vivo*, mice deficient for Arc showed a decrease of heterochromatin domains associated to a high RNA-Pol II activity. These mice showed an exacerbated psychomotor sensitization to low doses of cocaine. Our data support that the nuclear pool of Arc influences chromatin remodeling and participates to the homeostatic response to cocaine.

Arc induction has been reported in response to acute or chronic cocaine (34, 14). The restricted time-window of Arc expression that observed in the striatum in response to cocaine is consistent with the tight activity-dependent control of Arc expression described in other brain structures (21, 35). It is also in agreement with its rapid turnover at excitatory synapses, which involves its degradation by the Triad3A/RNF216 ubiquitin ligase proteasome (36). With regard to signaling cascades driving Arc expression, a D1R antagonist was previously shown to abolish Arc induction by acute cocaine (34). Herein, we confirm this observation and further demonstrate that Arc induction also strictly depends on NMDAR stimulation. Cocaine-mediated expression of Arc is thus at the crossroad of dopamine and glutamate inputs converging onto MSN. Consistently, we establish that Arc transcription and translation occur downstream from ERK activity, which behaves as a key integrator of D1R and NMDAR signaling in response to cocaine (23-25, 37). The promoter of Arc comprises two Serum Response Element (SRE) DNA regulatory elements that bind a ternary complex formed by the transcription factor Elk-1 and two molecules of Serum Response Factor. Mutation of one of these SRE sites blunted the late phase of cerebellar long-term depression (38), indicating that SRE-dependent transcription of Arc is critical for neuronal plasticity. We previously showed that ERK-mediated phosphorylation of Elk-1, which is necessary and

sufficient to trigger SRE-dependent transcription (39), was involved in cocaine-induced Arc induction (40). Our data thus support that cocaine-mediated Arc transcription critically relies on the ERK/Elk-1 signaling module.

Herein, we provide the first evidence that Arc clearly accumulates in the nucleus of MSN *in vivo* in response to cocaine. Arc has been detected in the nucleus of cultured hippocampal neurons (12) where it translocates in an activity-dependent manner (13). Accordingly, we also observed an activity-dependent nuclear accumulation of Arc by live imaging of cultured MSN. To date, the role of this nuclear pool of Arc remains elusive and emerged only recently, while its functions at synaptic sites have been extensively explored. Initial observations indicated that changes in neuronal activity increased Arc in both nuclei and soma, but Arc was enriched in dendrites where it co-precipitates with F-actin (35). Since then, most of its roles in neuronal plasticity have been described at the level of synapses and involve regulation of cytoskeleton dynamics, AMPAR trafficking and synaptic strength (8-9, 41). Although cocaine induced a dendritic expression of Arc in the DM, we surprisingly found that the major impact of cocaine on Arc expression occurred in the nucleus. This was even clearer in the NAcc where nuclear Arc expression was increased in the absence of change in dendrites. With respect to its biochemical properties and a lack of DNA interaction consensus sequence, Arc is not likely to bind DNA or act as a transcription factor in the nucleus (35). What is known so far is that Arc binds to nuclear spectrin and PML bodies (12). PML bodies regulate transcription, notably by controlling the availability and histone acetyltransferase (HAT) activity of CBP and p300 (42), but the role of Arc within PML bodies remains controversial. In cultured hippocampal neurons, increased neuronal activity triggers a nuclear localization of Arc within PML bodies, which decreases CBP-mediated transcription of GluA1 AMPAR subunit (13). By contrast, Arc also interacts with the HAT Tip60 at PML bodies and increases the acetylation of H4K12 (43), a histone mark associated with increased transcription and

learning and memory. We report the first *in vivo* demonstration of a co-localization of Arc with pH3, within active zones of transcription in the nucleus of MSN after exposure to cocaine. This histone mark is critical for the transcriptional regulation of IEGs, including *c-fos* and *c-jun*, in response to many extracellular stimuli (44-46). In cultured MSN, we previously showed that pH3 increases at the promoter of these IEGs in response to glutamate and is necessary for their expression. This phosphorylation event involves the nuclear kinase MSK-1 downstream from ERK (27). Importantly, pH3 is also critical for cocaine-induced gene regulation *in vivo*, and is regulated by the ERK/MSK1 signaling module, along with DARPP32 nuclear translocation (20, 47). Arc overexpression in cultured MSN significantly decreased glutamate-induced pH3, thus showing that Arc plays a negative retro-control on transcription. This negative feedback is unlikely due to an effect of Arc overexpression on AMPAR trafficking since ERK activation and nuclear translocation, which involve glutamate-induced endocytosis of AMPAR (48), were preserved. By contrast, Arc inhibited glutamate-induced MSK-1 activation in the nucleus (**Fig. S 2E**). However, this inhibitory effect was weaker than the decrease of pH3 itself, supporting that additional mechanisms are engaged by Arc to alter pH3.

In vivo, acute cocaine triggered a decrease in heterochromatin content of Wt mice. Persistent decreases in heterochromatin also occur after repeated cocaine, which suggests a potential role of heterochromatin organization in the long-term effects of cocaine (31). In KI mice, we found a drastic decrease of heterochromatin, thereby indicating a global relaxing of chromatin in the absence of Arc. This was observed regardless of cocaine treatment, suggesting that low basal levels of nuclear Arc detected in the absence of cocaine are sufficient to promote DNA compaction. The decompaction of DNA induced by cocaine in Wt mice was associated with an activation of RNA-Pol II activity, which is in agreement with the boost of activity-dependent transcription induced by cocaine (1,2). In KI mice, the constitutive decrease of

heterochromatin was combined with high levels of RNA-Pol II activity, two intracellular events favoring transcription. Altogether, these data support that Arc exerts a negative retro-control on transcription, by limiting chromatin decompaction and RNA-Pol II activity. This impact of Arc on such global nuclear events may have important implications for its well-known homeostatic functions.

Arc expression is correlated to neuronal processing underlying learning and memory storage (49,50) and mice deficient for Arc have severe deficit in the consolidation of long-term synaptic plasticity and memory (51). In the striatum, Arc induction is associated with early phase of learning as well as inversion phase during reversal learning, suggesting a role in striatal plasticity underlying learning acquisition. (52,53). In the context of addiction, Arc is increased by cocaine (14-15) or upon re-exposure to a context previously associated with the drug (16). In rats that trained to self-administer cocaine, the local inhibition of Arc in the dorso-lateral part of the striatum did not impact cocaine-seeking but blocked extinction of this behavior (19), a result in agreement with the increased Arc expression during reversal learning and changes of rules (53).

To the best of our knowledge, no causal link has been established between Arc expression and the development of long-term behavioral alterations to cocaine. Arc induction has been correlated to the level of psychomotor sensitization and the rate of cocaine delivery (54). With regard to self-administration, individuals considered as vulnerable showed lower *Arc* mRNA expression in the DM, whereas resilient rats displayed high mRNA levels (55). Accordingly, we showed here that at a high dose of cocaine, which triggers psychomotor sensitization of Wt mice, leads to and increased locomotor activity and sensitization of KI mice, revealing a pre-sensitization to the drug in the absence of Arc. This is in agreement with the inhibitory role of Arc we established on pH3 phosphorylation, chromatin decompaction, and activity of RNA-PolII activity. This suggests that Arc deficiency removes a brake on

Salery et al.

chromatin remodeling and transcription of genes involved in long-term behavioral adaptation. One can speculate that the removal of Arc recapitulates some of the molecular events taking place in the nucleus in response to acute cocaine in Wt animal. This may predispose the brain to over-react to subsequent cocaine exposure. Consistently, when using a low dose of cocaine that does not trigger behavioral sensitization in Wt mice, mice deficient for Arc clearly developed psychomotor sensitization. These new facets of Arc's functions suggest that modulating levels of Arc may provide interesting therapeutic approaches.

ACKNOWLEDGMENTS AND FINANCIAL DISCLOSURES:

This work was supported by Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM), University Pierre et Marie Curie Paris VI (UPMC), Agence Nationale pour la Recherche (ANR), Fondation Jérôme Lejeune, Fondation pour la Recherche Médicale (FRM), the Bio-Psy labex cluster of excellence and the Ecole des Neurosciences de Paris (ENP). SM and DSM were the recipients of a fourth-year fellowship from the labex Bio-Psy. SJE was the recipient of fellowship from the ENP network. ML had a post-doc fellowship from the Association Française contre la Myopathie (AFM). Authors wish to thank the imaging and animal house facilities of the Institute of Biology Paris Seine (IBPS) as well as Dr Nicolas Heck for his helpful advises on confocal imaging and Dr Antoine Besnard for instrumental comments on immunohistochemistry experiments. Authors are also grateful to present and past members of the laboratory for their technical help with the primary cultures, for helpful discussions and critical reading of the manuscript. Authors also warmly thank Christiane Pagès for all these years spent handling brain slices for the all members of the laboratory with a lot of dexterity and achievement. The authors report no biomedical financial interest or conflicts of interest.

REFERENCES

- 1- Lüscher C, Malenka RC (2011): Drug-evoked synaptic plasticity in addiction: from molecular changes to circuit remodeling. *Neuron* 69:650-663.
- 2- Robison AJ, Nestler EJ (2011): Transcriptional and epigenetic mechanisms of addiction. *Nat Rev Neuroscience* 12:623-637.
- 3- Rao VR, Pintchovski SA, Chin J, Peebles CL, Mitra S, Finkbeiner S (2006) AMPA receptors regulate transcription of the plasticity-related immediate-early gene Arc. *Nat Neurosci* 9:887-895.
- 4- Link W, Konietzko U, Kauselmann G, Krug M, Schwanke B, Frey U *et al.* (1995) Somatodendritic expression of an immediate early gene is regulated by synaptic activity. *Proc Natl Acad Sci USA* 92:573-578.
- 5- Steward O, Wallace CS, Lyford GL, Worley PF (1998) Synaptic activation causes the mRNA for the IEG Arc to localize selectively near activated postsynaptic sites on dendrites. *Neuron* 21:741-751.
- 6- Larsen MH, Olesen M, Woldbye DP, Hay-Schmidt A, Hansen HH, Ronn LC *et al.* (2005) Regulation of activity-regulated cytoskeleton protein (Arc) mRNA after acute and chronic electroconvulsive stimulation in the rat. *Brain Res* 1064:161-165.
- 7- Bramham CR, Alme MN, Bittins M, Kuipers SD, Nair RR, Pai B, *et al.* (2010) The Arc of synaptic memory. *Exp Brain Res* 200:125-140.
- 8- Chowdhury S, Shepherd JD, Okuno H, Lyford G, Petralia RS, Poth N, *et al.* (2006) Arc/Arg3.1 interacts with the endocytic machinery to regulate AMPA receptor trafficking. *Neuron* 52:445-459.
- 9- Shepherd JD, Rumbaugh G, Wu J, Chowdhury S, Poth N, Kuhl D, *et al.* (2006) Arc/Arg3.1 mediates homeostatic synaptic scaling of AMPA receptors. *Neuron* 52:475-484.
- 10- Guzowski F, Lyford GL, Stevenson GD, Houston FP, McGaugh JL, Worley PF, *et al.* (2000) Inhibition of activity-dependent arc protein expression in the rat hippocampus impairs the maintenance of long-term potentiation and the consolidation of long-term memory. *J Neurosci* 20:3993-4001.
- 11- Waung MW, Pfeiffer BE, Nosyreva ED, Ronesi JA, Huber KM (2008) Rapid translation of Arc/Arg3.1 selectively mediates mGluR-dependent LTD through persistent increases in AMPAR endocytosis rate. *Neuron* 59:84-97.
- 12- Bloomer WA, VanDongen HM, VanDongen AM (2007) Activity-regulated cytoskeleton-associated protein Arc/Arg3.1 binds to spectrin and associates with nuclear promyelocytic leukemia (PML) bodies. *Brain Res* 1153:20-33.
- 13- Korb E, Wilkinson CL, Delgado RN, Lovero KL, Finkbeiner S (2013) Arc in the nucleus regulates PML-dependent GluA1 transcription and homeostatic plasticity. *Nat Neurosci* 16:874-883.

- 14- Fumagalli F, Bedogni F, Frasca A, Di Pasquale L, Racagni G, *et al.* (2006) Corticostriatal up-regulation of activity-regulated cytoskeletal-associated protein expression after repeated exposure to cocaine. *Mol Pharmacol* 70:1726-34.
- 15- Fumagalli F, Franchi C, Caffino L, Racagni G, Riva MA, Cervo L (2009) Single session of cocaine intravenous self-administration shapes goal-oriented behaviours and up-regulates Arc mRNA levels in rat medial prefrontal cortex. *Int J Neuropsychopharmacol* 12:423-429.
- 16- Hearing MC, See RE, McGinty JF (2008a) Relapse to cocaine-seeking increases activity-regulated gene expression differentially in the striatum and cerebral cortex of rats following short or long periods of abstinence. *Brain Struct Funct* 213:215-227.
- 17- Hearing MC, Miller SW, See RE, McGinty JF (2008b) Relapse to cocaine seeking increases activity-regulated gene expression differentially in the prefrontal cortex of abstinent rats. *Psychopharmacology (Berl.)* 198:77-91.
- 18- Zavala AR, Osredkar T, Joyce JN, Neiswander JL (2008) Upregulation of Arc mRNA expression in the prefrontal cortex following cue-induced reinstatement of extinguished cocaine-seeking behavior. *Synapse* 62:421-431.
- 19- Hearing MC, Schwendt M, McGinty JF (2011) Suppression of activity-regulated cytoskeleton-associated gene expression in the dorsal striatum attenuates extinction of cocaine-seeking. *Int J Neuropsychopharmacol* 14:784-795.
- 20- Bami-Cherrier K, Valjent E, Hervé D, Darragh J, Corvol JC, Pages C, *et al.* (2005) Parsing molecular and behavioral effects of cocaine in mitogen- and stress-activated protein kinase-1 deficient mice. *J Neurosci* 25:11444-11454.
- 21- Shepherd JD, Bear MF (2011) New views of Arc, a master regulator of synaptic plasticity. *Nat Neurosci* 14:279-284.
- 22- Pascoli V, Besnard A, Hervé D, Pages C, Heck N, Girault JA, *et al.* (2011) Cyclic adenosine monophosphate-independent tyrosine phosphorylation of NR2B mediates cocaine-induced extracellular signal-regulated kinase activation. *Biol Psychiatry* 69:325-336.
- 23- Cahill E, Pascoli V, Trifilieff P, Savoldi D, Kappès V, Lüscher C, *et al.* (2014a) D1R/GluN1 complexes in the striatum integrate dopamine and glutamate signaling to control synaptic plasticity and cocaine-induced responses. *Mol Psychiatry* 19: 1295-1304.
- 24- Pascoli V, Cahill E, Bellivier F, Caboche J, Vanhoutte P (2014) Extracellular signal-regulated protein kinases 1 and 2 activation by addictive drugs: a signal towards pathological adaptation. *Biol Psychiatry* 76:917-926.
- 25- Cahill E, Salery M, Vanhoutte P, Caboche J (2014b) Convergence of dopamine and glutamate signaling onto striatal ERK activation in response to drugs of abuse.
- 26- Heck N, Betuing S, Vanhoutte P, Caboche J. (2012) A deconvolution method to improve automated 3D-analysis of dendritic spines: a application to a mouse model of Huntington's disease. *Brain Struct Funct* 217:421-434.

- 27- Brami-Cherrier K, Lavour J, Pagès C, Arthur JS, Caboche J (2007) Glutamate induces histone H3 phosphorylation but not acetylation in striatal neurons: role of mitogen- and stress-activated kinase-1. *J Neurochem* 101:697-708.
- 28- Lavour J, Bernard F, Trifilieff P, Pascoli V, Kappès V, *et al.* (2007) A TAT-DEF-Elk-1 peptide regulates the cytonuclear trafficking of Elk-1 and controls cytoskeleton dynamics. *J Neurosci* 27:14448-14458.
- 29- Wang KH, Majewska A, Schummers J, Farley B, Hu C, Sur M, *et al.* (2006) In vivo two-photon reveals a role of arc in enhancing orientation specificity in visual cortex. *Cell* 126:389-402.
- 30- Matamalas M, Bertran-Gonzalez J, Salomon L, Degos B, Deniau JM, Valjent E, *et al.* (2009) Striatal medium-sized spiny neurons: identification by nuclear staining and study of neuronal subpopulations in BAC transgenic mice. *PLoS One* 4:e4770.
- 31- Maze I, Feng J, Wilkinson MB, Sun H, Shen L, Nestler EJ (2011) Cocaine dynamically regulates heterochromatin and repetitive element unsilencing in the nucleus accumbens. *Proc Natl Acad Sci USA* 108:3035-3040.
- 32- Sims RJ 3rd, Mandal SS, Reinberg D (2004) Recent highlights of RNA-polymerase-II-mediated transcription. *Curr Opin Cell Biol* 16:263-271.
- 33- Meinhart A, Kamenski T, Hoepfner S, Baumli S, Cammer P (2005) A structural perspective of CTD function. *Genes Dev* 19:1401-14015.
- 34- Fosnaugh JS, Bhat RV, Yamagata K, Worley PF, Baraban JM (1995) Activation of arc, a putative “effector” immediate early gene, by cocaine in rat brain. *J Neurochem* 64:2377-2380.
- 35- Lyford GL, Yamagata K, Kaufmann WE, Barnes CA, Sanders LK, Copeland NG, *et al.* (1995) Arc, a growth factor and activity-regulated gene, encodes a novel cytoskeleton-associated protein that is enriched in neuronal dendrites. *Neuron* 14:433-445.
- 36- Mabb AM, Je HS, Wall MJ, Robinson CG, Larsen RS, Qiang Y, *et al.* (2014) Triad 3A regulates synaptic strength by ubiquitination of Arc. *Neuron* 82:1299-1316.
- 37- Girault JA, Valjent E, Caboche J, Hervé D (2007) ERK2: a logical and gate critical for drug-induced plasticity? *Curr Opin Pharmacol* 7:77-85.
- 38- Smith-Hicks C, Xiao B, Deng R, Ji Y, Zhao X, Shepherd JD, *et al.* (2010) SRF binding to SRE 6.9 in the Arc promoter is essential for LTD in cultured Purkinje cells. *Nat Neurosci* 13:1082-1089.
- 39- Besnard A, Galan-Rodriguez B, Vanhoutte P, Caboche J (2011a) Elk-1 a transcription factor with multiple facets in the brain. *Front Neurosci* 5:35.
- 40- Besnard A, Bouveyron N, Kappès V, Pascoli V, Pagès C, Heck N, *et al.* (2011b) Alterations of molecular and behavioral responses to cocaine by selective inhibition of Elk-1 phosphorylation. *J Neurosci* 31: 14296-14307.

- 41- Messaoudi E, Kanhema T, Soulé J, Tiron A, Dageyte G, da Silva B *et al.* (2007) Sustained Arc/Arg3.1 synthesis controls long-term potentiation consolidation through regulation of local actin polymerization in the dentate gyrus in vivo. *J Neurosci* 27:10445-10455.
- 42- Boisvert FM, Kruhlak MJ, Box A K, Hendel MJ, Bazett-Jones DP (2001) The transcription coactivator CBP is a dynamic component of the promyelocytic leukemia nuclear body. *J Cell Biol* 152:1099-1106.
- 43- Wee CL, Teo S, Oey NE, Wright GD, VanDongen HMA, *et al.* (2014) Nuclear Arc interacts with histone acetyltransferase Tip60 to modify H4K12 acetylation. *eNeuro* DOI:<http://dx.doi.org/10.1523/ENEURO.0019-14.2014>
- 44- Mahadevan LC, Willis AC, Barratt MJ (1991) Rapid histone H3 phosphorylation in response to growth factors, phorbol esters, okadaic acid, and protein synthesis inhibitors. *Cell* 65:775-783.
- 45- Chadee DN, Hendzel MJ, Tyliński CP, Allis CD, Bazett-Jones DP, Wright JA, *et al.* (1999) Increased Ser-10 phosphorylation of histone H3 in mitogen-stimulated and oncogene-transformed mouse fibroblasts. *J Biol Chem* 274:24914-24920.
- 46- Thomson S, Mahadevan LC, Clayton AL (1999) MAP kinase-mediated signalling to nucleosomes and immediate-early gene induction. *Semin Cell Dev Biol* 10:205-214.
- 47- Stipanovich A, Valjent E, Matamales M, Nishi A, Ahn JH, Maroteux M, *et al.* (2008) A phosphatase cascade by which rewarding stimuli control nuclear response. *Nature* 453:879-884.
- 48- Trifilieff P, Lavour J, Pascoli V, Kappès V, Bami-Cherrier K, Pagès C *et al.* (2009) Endocytosis controls glutamate-induced nuclear accumulation of ERK. *Mol Cell Neurosci* 41:325-336.
- 49- Guzowski JF, McNaughton BL, Barnes CA, Worley PF (1999) Environment-specific expression of the immediate-early gene Arc in hippocampal neuronal ensembles. *Nat Neurosci* 2:1120-1124.
- 50- Guzowski JF, Setlow B, Wagner EK, McGaugh JL (2001) Experience-dependent gene expression in the rat hippocampus after spatial learning: a comparison of the immediate-early genes Arc, c-fos, and Zif 268. *J Neurosci* 21:5089-5098.
- 51- Plath N, Ohana O, Dammermann B, Errington ML, Schmitz D, Gross C, *et al.* (2006) Arc/Arg3.1 is essential for the consolidation of synaptic plasticity and memories. *Neuron* 52:437-444
- 52- Kelly MP, Deadwyler SA (2003) Experience-dependent regulation of the immediate-early gene Arc differs across brain regions. *J Neurosci* 23:6443-6451.
- 53- Daberkow DP, Reidy MD, Kesner RP, Keefe KA (2007) Arc mRNA induction in striatal efferent neurons associated with response learning. *Eur J Neurosci* 26:228-241.

Salery et al.

54- Samaha AN, Mallet N, Ferguson SM, Gonon F, Robinson TE (2004) The rate of cocaine administration alters gene regulation and behavioral plasticity: implications for addiction. *J Neurosci* 24:6362-6370.

55- Quinn RK, Brown AL, Goldie BJ, Levi EM, Dickson PW, Smith DW, *et al.* (2015) Distinct miRNA expression in dorsal striatal subregions is associated with risk for addiction in rats. *Transl. Psychiatry* 5:e503.

FIGURE LEGENDS:

Figure 1 : Kinetics and pharmacological profile of cocaine-induced Arc mRNA and protein synthesis in the striatum. (A) Striatal *Arc* mRNA levels were measured at the indicated time points after saline (grey) or cocaine (20 mg/kg; black) injections. Results are expressed as fold increase normalized to saline levels for each time point. $n = 3-4$ mice per group; two-way ANOVA: interaction between treatment and time, $F_{(5,24)} = 8.96$, $p < 0.001$; effect of treatment, $F_{(1,24)} = 66.68$, $p < 0.001$; effect of time, $F_{(5,24)} = 8.96$, $p < 0.001$, followed by post-hoc comparisons (Bonferroni's test). *** $p < 0.001$, cocaine group vs saline group; °°° $p < 0.001$, °° $p < 0.01$, each time point vs 15' group. **(B)** Representative images of the Arc immunofluorescent staining from brain slices prepared from mice sacrificed 1h after saline (left) or cocaine (right) administration. The chosen areas to acquire higher magnification pictures of the dorso-median striatum (DM) and nucleus accumbens (NAcc) are indicated by white rectangles and asterisks (scale bar: 500 μ m). **(C)** Illustrative confocal images at higher magnification of the Arc staining in the DM (left) and NAcc (right) from the areas delineated in B (scale bar: 30 μ m). **(D)** Quantifications of the number of Arc positive cells per mm^2 at the indicated time points after saline (grey) or cocaine (black) injection in the DM (left) and NAcc (right). $n = 4-8$ mice per group; two-way ANOVA in the DM: interaction between treatment and time, $F_{(4,49)} = 10.45$, $p < 0.001$; effect of treatment, $F_{(1,49)} = 49.46$, $p < 0.001$; effect of time, $F_{(4,49)} = 10.75$, $p < 0.001$ and in the NAcc: interaction between treatment and time, $F_{(5,55)} = 7.23$, $p < 0.001$; effect of treatment, $F_{(1,55)} = 26.67$, $p < 0.001$; effect of time, $F_{(5,55)} = 18.03$, $p < 0.001$, followed by post-hoc comparisons (Bonferroni's test). *** $p < 0.001$ cocaine group vs saline group; °°° $p < 0.001$, each time point vs 15' group. **(E)** Quantifications of Arc-positive cells in the DM and NAcc from mice treated with saline or cocaine for 1h with or without a 30 min pre-treatment with 100 mg/kg of anisomycin (aniso). $n = 4-5$ mice per group; one-way ANOVA in the DM: $F_{(2,11)} = 17.46$, $p < 0.001$ and in the NAcc $F_{(2,12)} = 152.9$, $p < 0.001$, followed by post-hoc comparisons (Bonferroni's test). *** $p < 0.001$, saline

or anisomycin pre-treated cocaine groups vs saline pre-treated saline group. **(F)** Effect of a pre-treatment with MK801 (0.1 mg/kg) or SCH23390 (0.2 mg/kg) on the induction of Arc protein 1h after cocaine administration. $n = 4-6$ mice per group; one-way ANOVA in the DM: $F_{(3,16)} = 12.12$, $p < 0.001$ and in the NAcc: $F_{(3,16)} = 12.12$, $p < 0.001$, followed by post-hoc comparisons (Bonferroni's test). $***p < 0.001$, saline, MK801 or SCH23390 pre-treated cocaine groups vs saline pre-treated saline group. **(G)** Impact of a pre-treatment with SL327 (50 mg/kg) on cocaine-induced Arc mRNA (left panel); $n = 5$ mice per group; one-way ANOVA: $F_{(2,12)} = 32.47$, $p < 0.001$, followed by post-hoc comparisons (Bonferroni's test). $***p < 0.001$, saline or SL327 pre-treated cocaine groups vs saline pre-treated saline group and Arc protein (right panels) at 45 or 60 min cocaine post-injection, respectively. $n = 8$ mice per group; one-way ANOVA in the DM: $F_{(2,21)} = 23.54$, $p < 0.001$ and in the NAcc $F_{(2,16)} = 13.67$, $p < 0.001$, followed by post-hoc comparisons (Bonferroni's test). $***p < 0.001$, saline or SL327 pre-treated cocaine groups vs saline pre-treated saline group.

Figure 2: Cocaine induces a preferential increase of Arc in the nucleus of striatal neurons.

(A) Maximum z projection of a stack of confocal images of a dendritic fragment visualized from a MSN stained with DyeI (red) and the corresponding Arc labeling (green) detected 1h after cocaine administration. The merge of the two signals illustrates that Arc is expressed in the dendritic shaft and in dendritic spines (*) as expected (Scale bar: 10 μ m). **(B)** Single confocal plan from a striatal slice prepared 1h after a cocaine administration. Nuclei are counterstained with Hoechst (blue) and Arc is detected in red. The merge shows that Arc is expressed in somatic, dendritic and nuclear compartments (scale bar: 10 μ m). **(C)** Diagram summarizing the principle of the custom routine used to separate the Arc signal outside and within nuclei. A single confocal plan of Arc (red) and Hoechst (blue) signals is acquired after

double staining from the same striatal slice (left panel; scale bar 30 μ m). After automatic detection of the nuclei, the corresponding signal is subtracted from the image acquired in the red channel. The resulting image corresponds to the Arc signal in all sub-cellular compartments except the nucleus (- nuclei) as illustrated in the insert (scale bar: 10 μ m). To isolate the Arc signal in the nucleus, the signal corresponding to the nucleus (detected in the blue channel) is kept in the red image. Based on this automated approach the mean intensity of the total (**D**), the non-nuclear (neuropile; **E**) and the nuclear (**F**) Arc signals were measured in the DM and expressed as percentage of increase relative to the corresponding saline condition at each time point. n = 6-8 mice per group; two-way ANOVA: for total Arc signal: interaction between treatment and time, $F_{(5,54)} = 3.56$, $p < 0.01$; effect of treatment, $F_{(1,54)} = 6.88$, $p < 0.05$; effect of time, $F_{(5,54)} = 4.65$, $p < 0.01$, for non-nuclear Arc signal: interaction between treatment and time, $F_{(5,55)} = 3.18$, $p < 0.05$; effect of treatment, $F_{(1,55)} = 10.25$, $p < 0.01$; effect of time, $F_{(5,55)} = 3.18$, $p < 0.05$; for nuclear Arc signal: effect of interaction $F_{(5,55)} = 6.072$, $p < 0.001$; effect of treatment, $F_{(1,55)} = 20.25$, $p < 0.001$; effect of time, $F_{(5,55)} = 6.072$, $p < 0.001$ followed by post-hoc comparisons (Bonferroni's test). *** $p < 0.001$, * $p < 0.05$ cocaine group vs saline group; °°° $p < 0.001$, each time point vs 15' group. (**G**) The percentage of Arc-positive nuclei (i.e. above a fixed intensity threshold) has been calculated at each time point after saline or cocaine administration. n = 6-8 mice per group; two-way ANOVA: interaction between treatment and time $F_{(4,48)} = 5.95$, $p < 0.001$; effect of treatment, $F_{(1,48)} = 34.01$, $p < 0.001$; effect of time, $F_{(4,48)} = 12.66$, $p < 0.001$, followed by post-hoc comparisons (Bonferroni's test). *** $p < 0.001$, cocaine group vs saline group; °°° $p < 0.001$, each time point vs 15' group.

Figure 3: Within the nucleus Arc is excluded from heterochromatin and localized at the vicinity of an active chromatin marker. (A) Representative confocal images obtained from

a striatal slice prepared from a mouse that has been sacrificed 1h post-cocaine injection. Nuclei were counterstained with Hoechst (blue) and Arc is labeled in red (scale bar: 10 μ m). Right panel is a close-up of the nucleus with double labeling (scale bar: 2 μ m). The fusion of the two channels illustrates the exclusion of Arc puncta from nuclear domains with dense Hoechst labeling that corresponds to inactive zones of transcription (referred to as heterochromatin). **(B)** Mice were sacrificed 30 min after saline or cocaine administration and confocal sections were acquired from slices counterstained with Hoechst (blue), Arc (green) and phospho-Ser¹⁰ histone H3 (pH3; red; scale bar: 2 μ m). Upper right panel is a maximum z projection of pile of confocal images of the nuclear Arc and pH3 signal and the lower right panel is the same image displayed as a 3D view. **(C)** The proximity of Arc and pH3 was analyzed in 3D. n = 17 nuclei per group; unpaired t-test. ***p < 0.001, Arc colocalized with pH3 vs pH3 colocalized with Arc. **(D)** The number of cells that are immunoreactive for pH3 or Arc only and the ones that are positive for both Arc and pH3 was assessed by immunohistochemistry from mice that have been sacrificed 30 min (left) or 1h (right) after cocaine administration. n = 4-5 mice per group; unpaired t test for each marker. **p < 0.01, *p < 0.05, cocaine group vs saline group.

Figure 4: Overexpression of Arc alters histone H3, but not ERK1/2, phosphorylation *in vitro*. **(A)** Cultured striatal neurons were transfected with cDNA encoding Arc fused to GFP. Live imaging was performed and images were acquired before (basal) and at the indicated time point after application of glutamate 10 μ M. Note the progressive nuclear accumulation of the GFP-Arc signal in response to glutamate. **(B)** Shown are representative pictures of neurons transfected with GFP (top panels) or GFP-Arc (bottom panels), treated with glutamate (glu 10 μ M) for 30 minutes to induce histone Ser¹⁰-H3 phosphorylation (pH3). Nuclei are counterstained with Hoechst (blue), pH3 is red, GFP in green and the merge of

pH3 and GFP is shown on the right panels (Scale bar: 10 μ m). **(C)** Quantifications of the intensity of the pH3 labeling in transfected cells stimulated or not with glutamate. Results are expressed as % increase when compared to control neurons transfected with GFP. $n = 3-4$ independent experiments per group; two-way ANOVA: interaction between treatment and transfection, $F_{(1,16)} = 3.48$, NS; effect of treatment, $F_{(1,16)} = 18.54$, $p < 0.001$; effect of transfection, $F_{(1,16)} = 4.01$, ns, followed by post-hoc comparisons (Bonferroni's test). *** $p < 0.001$, control group (cont) vs glutamate group (glu); ° $p < 0.05$, GFP vs GFP-Arc plasmid. **(D)** Illustrations of neurons transfected as described in **(B)** and treated with glutamate for 10 minutes to induce the phosphorylation of ERK1/2 (pERK1/2; red; scale bar: 10 μ m). **(E)** Analyses of the intensity of the pERK1/2 labeling in transfected cells stimulated or not with glutamate. $n = 3-4$ independent experiments per group; two-way ANOVA: interaction between treatment and transfection, $F_{(1,12)} = 0.15$, ns, effect of treatment, $F_{(1,12)} = 54.94$, $p < 0.001$; effect of transfection, $F_{(1,12)} = 0.52$, ns, followed by post-hoc comparisons (Bonferroni's test). *** $p < 0.001$, control group (cont) vs glutamate group (glu).

Figure 5 : Deletion of Arc alters heterochromatin domains and promotes the phosphorylation of Polymerase II *in vivo*. **(A)** Homozygous Knock-in GFP-Arc (KI) and corresponding wild type littermate (Wt) were treated with saline or cocaine (20 mg/kg) and sacrificed 1h post-injection. Shown are representative confocal images acquired in the DM of nuclei counterstained with Hoechst and immunolabeling of Arc or GFP performed from Wt and KI mice, respectively. Arrowheads indicate the nuclei that were used for subsequent analyzes in which low (saline-treated mice) or high (cocaine-treated mice) levels of Arc or GFP were detectable (scale bar: 2 μ m). The number of Hoechst-positive puncta per nuclei was analyzed **(B)** as well as the distribution **(C)** of the different categories of nuclei according to the number of Hoechst puncta they display. $n = 800-1000$ neurons per group; Mann-

Whitney U test between each group. $*p < 0.05$, saline group vs cocaine group; $^{\circ\circ}p < 0.001$, Wt vs KI. The total area corresponding to Hoechst-positive puncta within nuclei (in μm^2) was measured **(D)** as well as the distribution of nuclei **(E)** depending on the area occupied by heterochromatin domains. 800-1000 neurons per group; Mann-Whitney U test between each group. $**p < 0.01$, saline group vs cocaine group; $^{\circ\circ}p < 0.001$, $^{\circ}p < 0.01$, Wt vs KI. **(F)** Wt and KI mice were treated with saline or cocaine and sacrificed 1h later to study the phosphorylation of the polymerase II on the Ser^2 of its C-terminal domain (p-Pol II) by immunohistochemistry (Scale bar: 15 μm). $n = 3-4$ mice per group; two-way ANOVA: interaction between treatment and genotype, $F_{(1,11)} = 2.27$, ns, effect of treatment, $F_{(1,11)} = 6.88$, $p < 0.05$; effect of genotype, $F_{(1,11)} = 9.12$, $p < 0.05$, followed by post-hoc comparisons (Bonferroni's test). $*p < 0.05$, saline group vs cocaine group; $^{\circ}p < 0.05$, Wt vs KI.

Figure 6: Arc deficiency augments behavioral sensitization to low doses of cocaine. (A) Time course of basal locomotor activity of GFP-Arc Wt (black), heterozygous (Het.; dark grey) and homozygous knock-in (KI; grey) mice and **(B)** corresponding area under the curve in arbitrary unit. $n = 11$ mice per group; one-way ANOVA: $F_{(1,12)} = 0.15$ followed by post-hoc comparisons (Bonferroni's test). $**p < 0.01$, Wt vs KI. **(C)** Diagram depicting the psychomotor sensitization protocol induced by two injections in which mice received a first injection of cocaine after a period of habituation and a second injection a week later of the same dose of cocaine. Mice of the three genotypes have been subjected to a protocol of psychomotor sensitization induced by two injections of cocaine at 15 mg/kg **(D)** or 7.5 mg/kg **(E)**. $n = 11$ mice per group; two-way ANOVA (repeated measure over time for matching data): for 15 mg/kg: interaction between genotype and time, $F_{(6,72)} = 3.63$, $p < 0.01$; effect of genotype, $F_{(2,72)} = 4.45$, $p < 0.05$; effect of time, $F_{(3,72)} = 64.90$, $p < 0.001$; for 7.5 mg/kg: interaction between genotype and time, $F_{(6,75)} = 2.99$, $p < 0.05$; effect of genotype, $F_{(2,75)} =$

Salery et al.

1.34, N S; effect of time, $F_{(3,75)} = 67.98$ $p < 0.001$ followed by post-hoc comparisons (Bonferroni's test). * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$, Day 1 vs Day 8 cocaine injection; °° $p < 0.01$, ° $p < 0.05$, Wt vs Het and Wt vs KI.

Figure 1; Sallery et al.

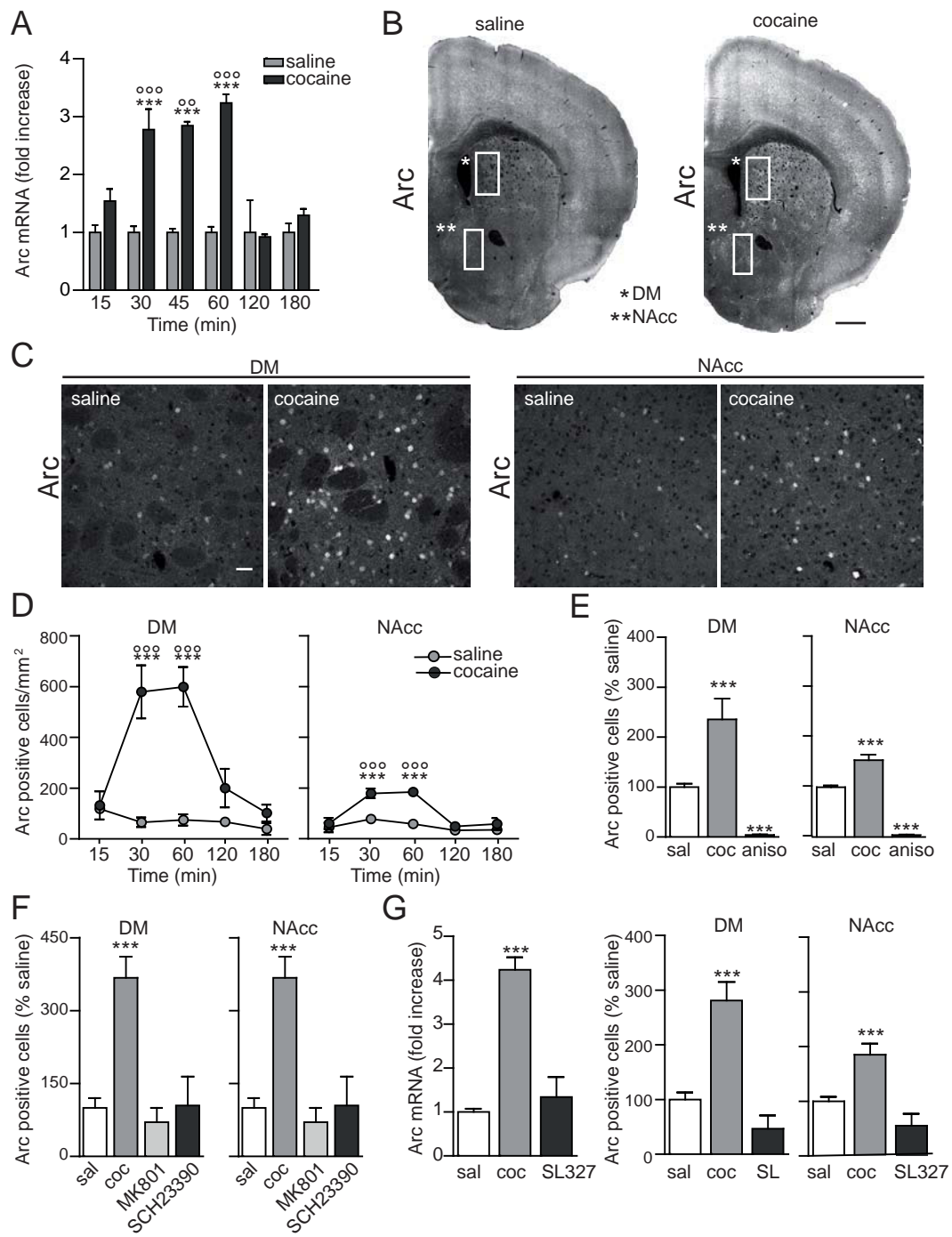


Figure 2; Sallery et al.

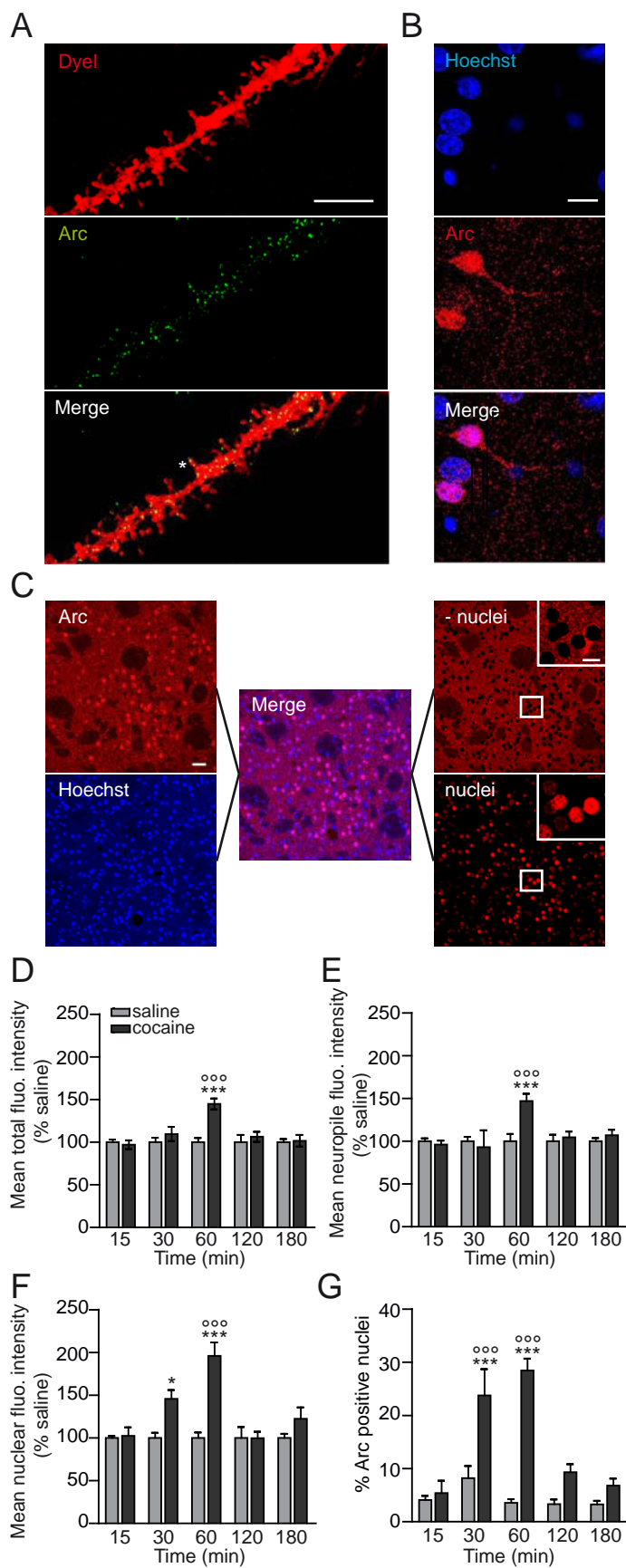


Figure 3; Sallery et al.

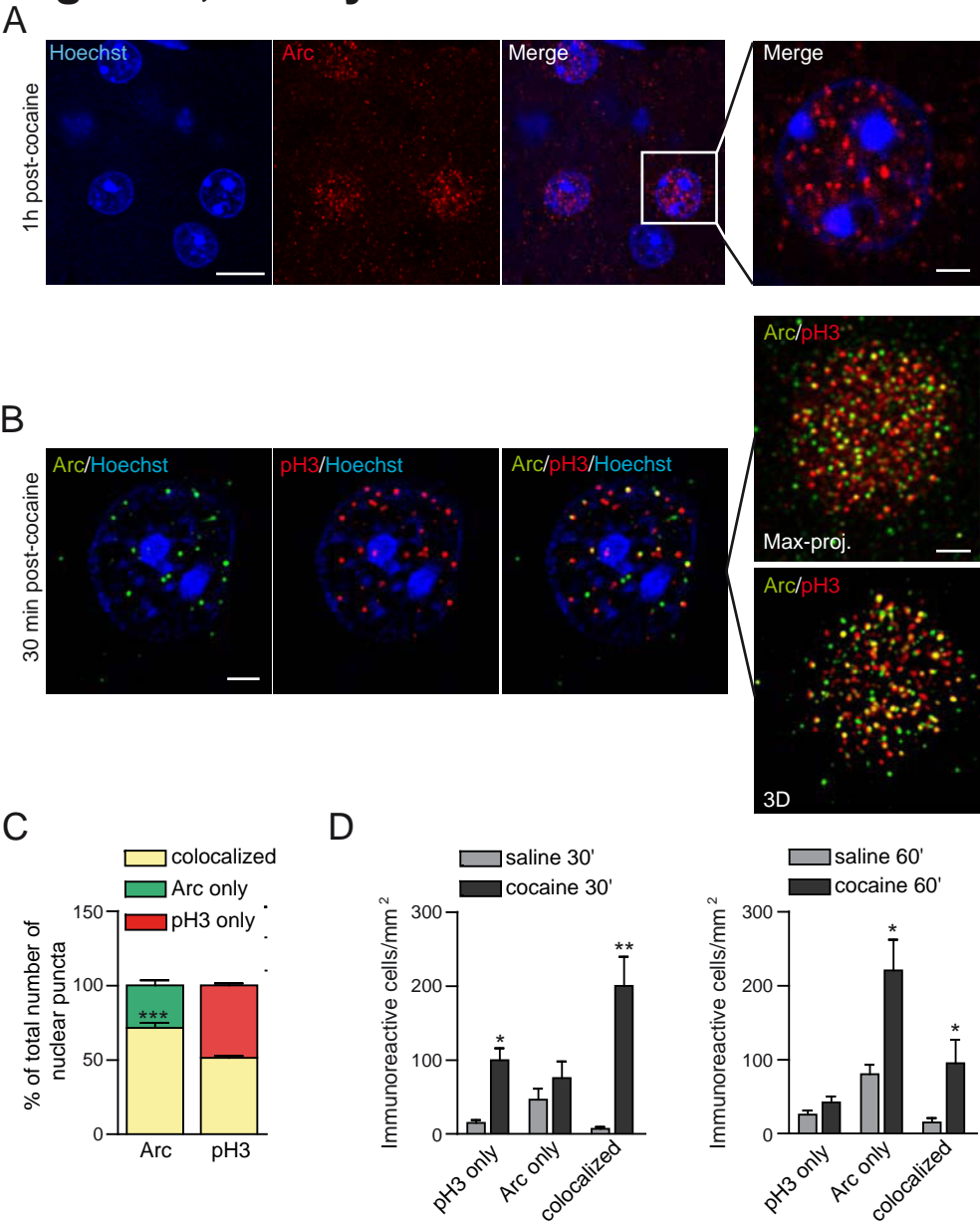
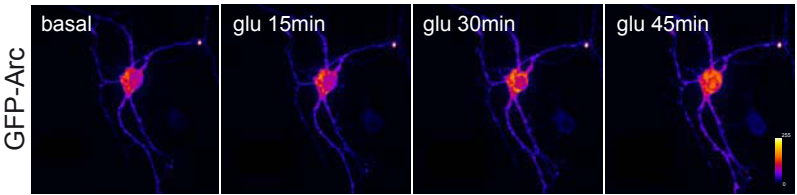
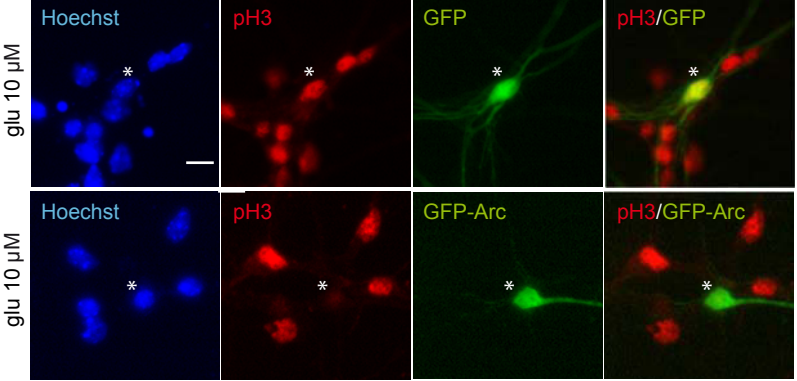


Figure 4; Salery et al.

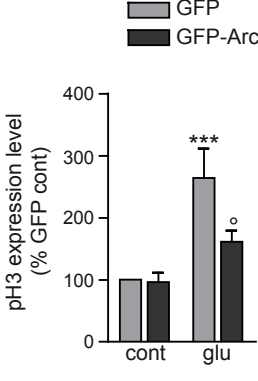
A



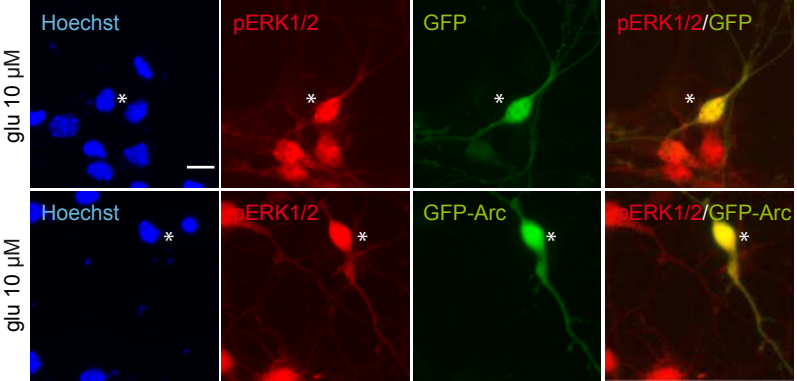
B



C



D



E

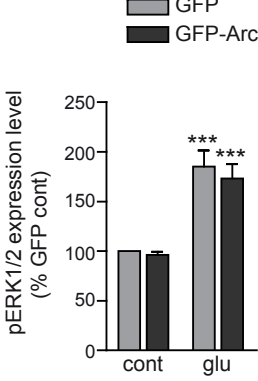


Figure 5; Sallery et al.

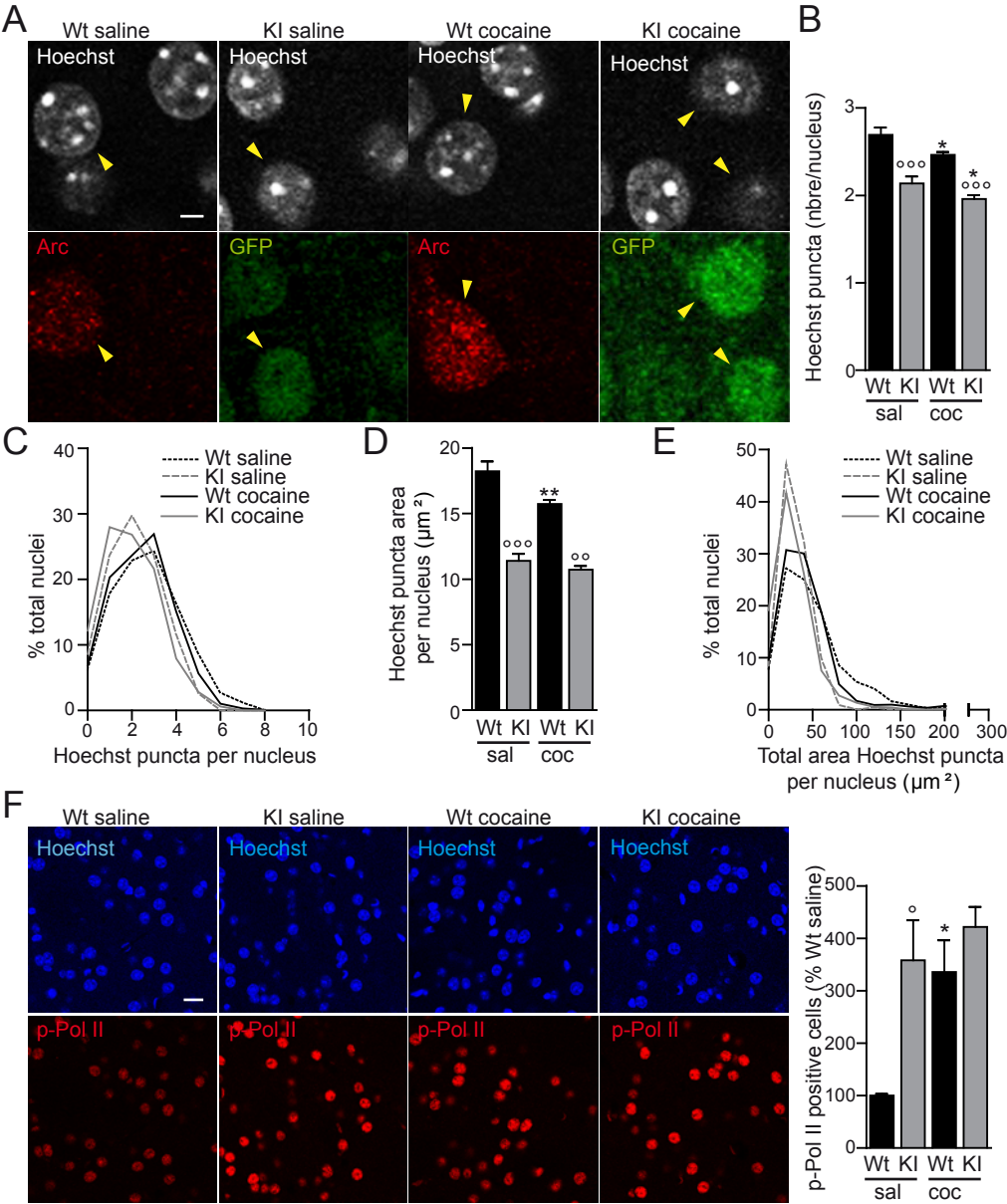
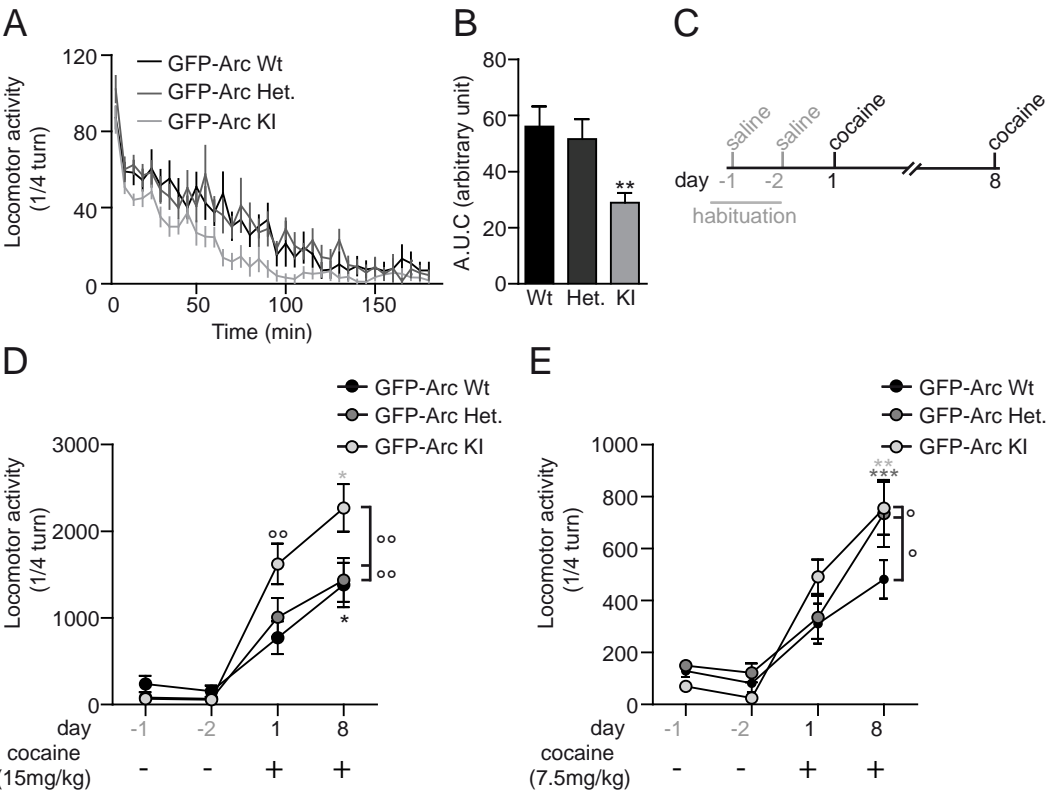


Figure 6; Sallery et al.



SUPPLEMENTAL INFORMATION

SUPPLEMENTARY METHODS AND MATERIALS

Animal and drugs

Mice C57BL/6 were purchased from Janvier (Le Genest, St. Isle, France). Eight-week-old males were maintained in a 12h light/dark cycle in stable conditions of temperature (22°C) and humidity (60%) with access to food and water *ad libitum*. Animals were allowed to habituate to the animal facility for one week prior to the experiments. Animal care was conducted in accordance with standard ethical guidelines (NIH publication no. 85-23, revised 1985 and European Community Guidelines on the Care and Use of Laboratory Animals (86/609/EEC)). The experiments were approved by the local ethic committee “Comité d’Ethique en Experimentation Animale Charles Darwin C2EA-05”. Adult Arc-GFP knock-in mice generated in C57BL/6 background (1) were purchased from Jackson laboratory (). Arc homozygous Knock-In (KI), heterozygous (Het) and wild-type (Wt) control mice were obtained by breeding Arc heterozygous. All experiments were conducted with 8 to 12 weeks-old adult males.

All drugs were administered intraperitoneally in a volume of 10 ml/kg. Cocaine hydrochloride (Sigma Aldrich, St. Louis, MO) dissolved in a 0.9% NaCl (w/v) aqueous solution (saline) was administered at the indicated doses. NMDA receptor antagonist (MK801; 0.1 mg/kg) dopaminergic D1 receptor antagonist (SCH23390; 0.2 mg/kg), Anisomycin (100 mg/kg) or the MEK inhibitor (SL327; 50 mg/kg) from Sigma Aldrich were administered 30’ prior to saline or cocaine injection.

Tissue preparation and Immunohistochemistry

At the indicated times after drug treatments (see *figure legends*), mice were rapidly anesthetized with an intraperitoneal injection of pentobarbital (50 mg/kg; Sanofi-Aventis,

Paris, France) and perfused transcardially with a fixative solution containing 4% paraformaldehyde (PFA) (w/v) in 0.1 M $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$, pH 7.5 at 4°C delivered with a peristaltic pump at 20 ml/min for 5 min. The brain was removed from the skull, post-fixed overnight in 4% PFA, and stored at 4°C. Sections of 30 μm thickness were cut in the frontal plane with a vibratome (Leica, Nussloch, Germany) and kept at -20°C in a solution containing 30% ethylene glycol (v/v), 30% glycerol (v/v) and 0.1 M phosphate buffer. Sections were then processed for immunohistochemistry as follows. On *day 1*, for all proteins excepted c-Fos, free-floating sections were rinsed three times for 10 min in Tris-buffered saline (TBS; 25 mM Tris-HCl and 0.5 M NaCl, pH 7.5) followed by a permeabilization step of 15 min in 0.2% Triton X-100 (Sigma Aldrich) in TBS. For the detection of all phosphorylated proteins, 50 mM NaF was added in buffers and incubation solutions as described previously (2). For Arc and GFP, an additional blocking step was performed and after three rinses in TBS, sections were incubated for one hour at RT with a blocking buffer (3% bovine serum albumin (BSA; w/v) in TBS). After three rinses in TBS, the sections were incubated overnight at 4°C with the primary antibodies (*see primary antibodies section*) in TBS or TBS containing 1% BSA (w/v) for Arc and GFP. For pH3 detection 0.01% Tween-20 (Sigma Aldrich) was added to the incubation solution. For c-Fos detection, *day 1* protocol was slightly modified as follows. Sections were rinsed three times in PBS and treated one hour at RT with a blocking buffer (10% fetal calf serum (FCS; v/v)) in a solution in 0.5% Triton X-100 in PBS. After three rinses in PBS, the sections were incubated overnight at 4°C with the primary antibody in PBS containing 10% FCS (v/v) and 0.5% Triton X-100. On *day 2*, sections were rinsed three times for 10 min in TBS (or PBS for c-Fos) and incubated for 90 min at RT in TBS (or PBS for c-Fos) with the following secondary antibodies: goat anti-rabbit Cy3-conjugated (1:500; GE Healthcare, Piscataway, NJ), goat anti-mouse Cy3-conjugated (1/500; GE Healthcare) or goat anti-chicken Alexa 488 (1/500; Invitrogen, Carlsbad, CA). For double labeling

experiments, goat anti-rabbit Alexa fluor 488 (1:500; Invitrogen) and goat anti-mouse Alexa Fluor 488 (1:500; Invitrogen) antibodies were used. After three rinses in TBS (or PBS for c-Fos), sections were incubated for 5 min with Hoechst (Invitrogen) to achieve counterstaining of nuclei. Sections were rinsed three times for 10 min in TBS (or PBS for c-Fos) and three times for 10 min in Tris Buffer (0.25 M Tris) before mounting in Vectashield (Vector Laboratories).

Primary striatal cell cultures

Cultures were obtained from striata dissected out from 14 day old Swiss mice embryos (Janvier). Cells were resuspended in Neurobasal medium supplemented with B27 (Invitrogen), 500 nM L-Glutamine, 60 µg/ml penicillin G and 25 µM β-mercaptoethanol (Sigma Aldrich) and plated at a density of 1,000 cells per mm² into Nunc 4-well plates (Dutscher, Brumath, France; for immunocytochemistry) or 8-µwell plates (Biovalley; for live videomicroscopy) coated with 50 µg/ml poly-D-lysine (Sigma Aldrich). Cultured media were changed at Day In Vitro (DIV) 7 and pharmacological treatments were performed at DIV8 by introducing compounds directly to the medium and placing the cells at 37°C in a humidified atmosphere of 95% air and 5% CO₂ for the appropriate time. Stimulations of striatal neurons were performed by adding L-glutamic acid (Calbiochem, San Diego, CA).

Plasmids and transfection

Arc-pEGFP-C1 plasmid (referred to as Arc-GFP) was generated by PCR from pEGFP-C1 plasmid (referred to as GFP) (GenBank Accession number U55763) using 5' - GGGCTCGAGCCATGGAGCTGGACCATATGACC-3' and 5' - GGGGAATTCCTATTCAGGCTGGGTCCTGT-3' primers. The coding sequence of mouse Arc was subcloned between the Xho1 and EcoR1 sites in C-terminal end of GFP. Transient

transfections of Arc-GFP or GFP plasmids were performed by using Lipofectamine 2000 (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions. Cells ($600/\text{mm}^2$) were transfected at DIV 7 with $1\text{ }\mu\text{g}$ of DNA for 3h. Neurons were then rinsed with fresh culture medium and put back to 37°C for 24h before pharmacological treatments.

Immunocytochemistry

At the indicated time after pharmacological treatments (see *figure legends*), the medium was removed and replaced by 4% paraformaldehyde (PFA) complemented with 4% sucrose for 20 min before permeabilization in a methanol/acetone (50/50) solution at 4°C for 10 min. After three rinses in PBS, plates were incubated with blocking buffer (10% fetal calf serum (FCS; v/v), 1% bovine serum albumin (BSA; w/v) in PBS) for 2h at RT for pH3 and for 1h with 10% normal goat serum (NGS; v/v) in PBS for other markers. After three rinses in PBS, cells were incubated overnight at 4°C with the anti-pH3 antibody in PBS containing 1% FCS and 0.01% Tween-20 (Sigma-Aldrich) or PBS containing 1% NGS for other primary antibodies. Plates were rinsed in PBS three times and incubated for 90 min at RT in PBS with following secondary antibodies: goat anti-rabbit Cy3-conjugated antibody (1:500; GE Healthcare) or goat anti-mouse Cy3-conjugated antibody (1:500; GE Healthcare). For double labeling experiments goat anti-rabbit Alexa fluor 488 (1:500; Invitrogen) and goat anti-mouse Alexa Fluor 488 (1:500; Invitrogen) were used. After three rinses in PBS, cells were incubated 5 min with Hoechst (Invitrogen) for counterstaining of nuclei and mounted under coverslips using Mowiol.

Primary antibodies

Arc expression was detected by using a mouse monoclonal antibody raised against Arc (1/30; Santa Cruz, Arc C-7) for classic immunohistochemistry procedures and a polyclonal rabbit

antibody raised against Arc (1/500; Synaptic System, 156 003) when immunohistochemistry was coupled to the diolistic labeling of dendrites. Polyclonal antibody against phospho-Ser-10-H3 [(pH3) (1/500; Millipore, Billerica, MA; reference 06570)], di phospho-Thr-202/Tyr-204-ERK1/2 (1/400; Cell Signaling Technology, Ipswich, MA; reference: 4370), phospho-Thr-581-MSK-1 (1/750; Cell Signaling Technology, 9595) were used. Phosphorylated form of RNA Polymerase II was detected with using a rabbit polyclonal antibody raised against phospho-S2-CTD repeat of RNA-PolII (1/10000; Abcam, Cambridge, MA, 5095). Expression of c-Fos immediate early gene was analyzed using rabbit polyclonal antibody raised against c-Fos (1/10000; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA; reference sc-52). Expression of GFP was visualized by using a chicken polyclonal anti-GFP antibody (1/1000; Aves Lab, Tigard, Oregon USA, reference 1020).

Image acquisition and analysis

Entire hemisphere reconstruction: Arc expression was visualized in entire hemispheres on frontal sections. Images were collected from ten adjacent sections spaced with 120 μ m at various bregma coordinates (Paxinos and Franklin, 2001) along the rostro-caudal axis. Images were acquired with a macroscope (ApoTome.2, Zeiss) Entire hemisphere image (8100 μ m X 6044 μ m) was reconstructed from 256 images (506.25 μ m X 377.75 μ m) stitched using ImageJ analyzer software.

Quantification of immunoreactive cells (Immunohistochemistry): Immunoreactive cells were quantified for each marker in the dorso-medial striatum (DM) and Nucleus Accumbens Shell (NAcc) as indicated by white rectangles on mouse coronal sections at various bregma coordinates along the rostro-caudal axis (see **Fig. 1B**) in a total of 12 different images (387.5 μ m x 387.5 μ m) per animal (i.e.: 1 image per structure, bilaterally, on three adjacent sections). Images were acquired bilaterally in a 16 -bits range using a Confocal Laser

Scanning Microscope (SP5, Leica) with a 40X oil immersion objective, Zoom 1, pixel size: $x = 0.38 \mu\text{m}$, $y = 0.38 \mu\text{m}$. Quantifications were performed using ImageJ analyzer software taking into account the cells with immunofluorescence above a fixed threshold

Nucleus vs neuropil fluorescence intensity assessment: Images were acquired with the same criteria and parameters described in the previous section. All images analyses were performed in ImageJ with custom-built procedures. Nuclei are segmented by a binarization of Hoechst signal using a user-defined threshold. Touching nuclei are separated by watershed and spots with an area inferior to $15 \mu\text{m}^2$ or superior to $120 \mu\text{m}^2$ are erased in order to avoid non-neuronal nuclei and segmentation of artifacts. The fluorescence is measured inside and outside the nuclei masks in order to discriminate proteins levels in neuropile or in the nucleus. The percent of positive nuclei is determined as the percent of nuclei upon a threshold defined by user relative to the total number of nuclei.

Arc and phospho-H3 colocalization within the nucleus: Images were acquired in the DM bilaterally in a 16-bits range using a Confocal Laser Scanning Microscope (SP5, Leica). Images were taken with a 63X oil immersion objective, Zoom 4, pixel size: $x = 0.06 \mu\text{m}$, $y = 0.06 \mu\text{m}$, $z = 0.21 \mu\text{m}$. For all images of Arc and phospho-H3 fluorescence at high magnification, a deconvolution using Maximum Likelihood Estimation algorithm was performed with Huygens 3.6 Software (Scientific Volume Imaging) as described in (3). This treatment aims at limiting light diffraction, which increases the accuracy of colocalization analyzes. 3D segmentation of intra nuclear Arc and pH3 spots at high resolution has been computed thanks to the 3D ImageJ Suite plugins (4) as already described in (5). The local maxima inside the nucleus are detected and defined as seeds of the spots. Then an adaptive threshold is automatically calculated for each object based on their intensity by measuring the signal in concentric spheres created around the seeds. This allows detecting the contour in 3D automatically without a user-defined threshold (5). Colocalization of Arc and pH3 spots is

Salery et al.

automatically analyzed using the same plugins, two spots with overlapping voxels are considered as colocalizing.

Quantification of immunoreactive cells (Immunocytochemistry): Images were acquired using a fluorescent microscope (Zeiss, Axioskop2) with a 20X objective, Zoom 1. 10 images were taken per condition and each condition was performed in duplicate. Quantifications were performed using ImageJ analyzer software taking into account the percent of transfected cells above a fixed threshold.

Time-lapse imaging of cultured striatal neurons: For live imaging, cultures were obtained from striata dissected out from P0 newborn Swiss mice processed with the same protocol than described above (see **Primary striatal cell cultures** section). Time-lapse sequences were collected using a Leica DM16000 inverted microscope (Leica) equipped with a Yokowaga CSU-X1 spinning disc confocal head (Roper Scientific) and a 100 mW 491 nm laser controlled by MetaMorph (Molecular Devices). The setup was enclosed in a thermal incubator set to 36°C. Images were collected with a 40X oil immersion objective. Acquisitions were performed every minute for 15 min before and 45 min after the addition of L-glutamic acid directly introduced in the medium.

Dendritic detection of Arc

Cartridge preparation and diolistic labeling were performed as described previously (3). Brain sections were transferred to glass surface, and the beads were delivered using a gene-gun device (Bio-Rad) through a 3 μ m pore-sized filter (Millipore), using helium gas pressure (120–150 psi). Slices were kept in buffer at RT for at least 2 h before being processed for immunohistochemistry. For Arc detection, the protocol was slightly adapted from classic immunohistochemistry procedure as follows. On day 1, sections were rinsed three times for 10 min in TBS followed by a quick and gentle permeabilization step 3 min in 0.1 % Triton X-

100 in TBS. After three rinses in TBS, sections were incubated with a blocking buffer (3% bovine serum albumin (BSA; w/v) in TBS). Sections were rinsed three times in TBS and incubated overnight at 4°C with the primary antibodies in TBS containing 1% BSA (w/v). On day 2, sections were rinsed three times for 10 min in TBS and incubated for 90 min at RT in TBS with goat anti-rabbit Alexa fluor 488 (1:500; Invitrogen). Sections were rinsed three times for 10 min in TBS and three times for 10 min in Tris Buffer (0.25 M Tris) before mounting in Mowiol. Images were acquired bilaterally in DM in a 16-bits range using a Confocal Laser Scanning Microscope (SP5, Leica). Images were taken with a 63X oil immersion objective, Zoom 4, pixel size: $x = 0.06 \mu\text{m}$, $y = 0.06 \mu\text{m}$, $z = 0.21 \mu\text{m}$. For all images, deconvolution was performed with Huygens 3.6 Software (Scientific Volume Imaging) as previously described (3). Dendrites are segmented and only the Arc signal inside the mask is analyzed.

Striatal tissue collection and RNA isolation

At the indicated time after treatments (see *figure legends*), mice were sacrificed by decapitation and striata were dissected, snap-frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C until RNA isolation. Striata were homogenized in 500 μl of QiazolTM reagent (Qiagen, Courtaboeuf, France) using pestle. RNA extraction was performed with RNeasy Lipid Tissue Midi Kit (Qiagen) according to manufacturer's instructions. RNA concentration and quality were measured on nanovueTM spectrophotometer (GE Healthcare). Reverse transcription was performed with Maxima First Strand cDNA synthesis kit for RT-qPCR (Fermentas, Saint-Rémy-lès-Chevreuse, France) at 37°C for 30 min. Quantitative real-time PCR reactions were performed using LightCyclerTM 480 SYBR Green I Master according to the manufacturer's protocol and run on LightCyclerTM 480 device (Roche Diagnostics, Meylan, France). For each reactions ~ 20 ng of cDNA from individual animal were used. To minimize the

contribution of contaminating genomic DNA, primers were designed to span exon junctions. Amplification efficiency for each assay was determined by running a standard dilution curve. Expression of hypoxanthine guanine phosphoribosyltransferase 1 (*Hprt1*) transcript was used to normalize the cDNA amounts. The cycle threshold values were calculated automatically by LightCycler™ 480 SW 1.5 software with default parameters. All primers were designed using the NCBI primer tool arc (Forward: AATGCAGCTGAAGCAGCAGACCTG; Reverse: TCTCAGCAGCCTTGAGACCTGGTGT), *hprt1* (Forward: TTGCTCGAGATGTCATGAAGGA; Reverse: AGCAGGTCAGCAAAGAACTTATAG).

Locomotor activity and psychomotor sensitization

Locomotor activity was measured by using a circular corridor located in a soundproof testing room (Immetronic, Pressac, France). Locomotor activity was counted as the number of interruptions by the mice of two adjacent beams in a circular corridor containing four infrared beams placed at every 90° and expressed as the number of 1/4 turns/5 min. For spontaneous activity experiments, locomotor activity was recorded for 180 min during the first exposition of animals to the circular corridor. In cocaine sensitization experiments, mice were placed in the activity box for 120 min after injection of a saline solution during 3 consecutive days for habituation before the actual experiments were performed. The protocol of psychomotor sensitization consisted of two sessions of 120 min separated by one week, called day 1 and day 8. During the day 1 session, spontaneous activity was recorded for 60 min before cocaine injection at the indicated dose (see *figure legends*) and locomotor activity recorded for 1 h. One week later, on day 8, a second session was performed as described for day 1. Locomotor sensitization was evaluated as the recording of locomotor activity during the 60 min after cocaine injection on day 1 and day 8.

Statistics

All data are displayed as mean \pm SEM. The percentage of nuclear colocalization was expressed as a ratio of colocalized nuclear spots over the total number of nuclear spots for each protein and analyzed with unpaired Student's t-test. Immunohistochemistry and real-time qPCR performed for pharmacological studies were analyzed using one-way ANOVA between subjects followed by the post-hoc Newman-Keuls comparisons test. Nuclear Hoechst puncta were expressed as a ratio of Wt Saline and analyzed using one-way ANOVA followed by the post-hoc Bonferroni's test. Immunohistochemistry and qPCR performed for time course experiments as well as immunocytochemistry were analyzed with a mixed factor two-way ANOVA followed by the post-hoc Bonferroni's test. For Behavioral studies, a two-way ANOVA repeated-measure for matching data was performed followed by the post-hoc Bonferroni's test.

SUPPLEMENTARY FIGURE LEGENDS

Supplementary figure 1: Kinetics of mRNA induction by different doses of cocaine and distribution of Arc proteins. **(A)** Striatal *Arc* mRNA levels were measured at the indicated time points after injections of cocaine at 10 mg/kg (left) or 20 mg/kg (right). Results are expressed as fold increase normalized to the 0 minute time point. $n = 3-6$ mice per group; one-way ANOVA: for 10 mg/kg: $F_{(5,15)} = 6.03$, $p < 0.01$; for 20 mg/kg: $F_{(5,30)} = 10.31$, $p < 0.001$ followed by post-hoc comparisons (Dunnett's test). *** $p < 0.001$; ** $p < 0.01$; * $p < 0.05$, each time-point vs 0 min. **(B)** Representative images of the Arc immunofluorescent staining from brain slices prepared from mice sacrificed 1h after saline (top panels) or cocaine (20 mg/kg; bottom panels). For each level of the brain, the entire hemispheres have been reconstructed based on pictures acquired with a microscope and the rostro-caudal extension of Arc expression is shown with the lookup table Unionjack (Fiji) for better visualization of area of intense Arc expression displayed in white (scale bar: X 500 μm). **(C)** Quantifications of the number of Arc positive cells per mm^2 at the indicated time points after saline (grey) or cocaine at 10 mg/kg (black) injection in the DM (left) and NAcc (right). $n = 5$ mice per group; two-way ANOVA in the DM: interaction between treatment and time, $F_{(5,56)} = 3.87$, $p < 0.01$, effect of treatment, $F_{(1,56)} = 9.88$, $p < 0.01$; effect of time, $F_{(5,56)} = 7.28$, $p < 0.001$, and in the NAcc: interaction between treatment and time, $F_{(5,56)} = 4.18$, $p < 0.01$, effect of treatment, $F_{(1,56)} = 17.34$, $p < 0.001$; effect of time, $F_{(5,56)} = 11.60$, $p < 0.001$, followed by post-hoc comparisons (Bonferroni's test). *** $p < 0.001$; * $p < 0.05$, cocaine group vs saline group; °°° $p < 0.001$; °° $p < 0.01$, each time point vs 5 min group. **(D)** Co-labeling of Arc (red) and c-Fos (green) from a striatal slice obtained 1h after a single injection of cocaine at 20 mg/kg. Nuclei are counterstained with Hoechst (blue) and the merge of Arc and c-Fos signals is shown on the right panel (scale bar: 30 μm). The numbers of cells per mm^2 that are immunopositive only for Arc (red), only for c-Fos (green), or for both Arc and c-Fos

(Arc+Fos) have been quantified in the DM (bottom left) and NAcc (bottom right). $n = 4$ mice per group were analyzed in the DM and the NAcc using unpaired t-test. $***p < 0.001$, cocaine group vs saline group.

Supplementary figure 2: Cocaine-induced Arc expression and sub-cellular distribution in the NAcc *in vivo* and impact of Arc overexpression on MSK-1 phosphorylation *in vitro*.

Based on the computer-based routine described in Fig. 2C the mean intensity of the total **(A)**, the non-nuclear (neuropile; **B**) and the nuclear **(C)** Arc signals were measured in the NAcc and expressed as percentage of increase relative to the corresponding saline condition at each time point. $n = 6-8$ mice per group; two-way ANOVA: for total Arc signal: interaction between treatment and time, $F_{(4,39)} = 0.92$, not significant (ns); effect of treatment, $F_{(1,39)} = 0.38$, ns; effect of time, $F_{(4,39)} = 0.92$, ns; for non-nuclear Arc signal: interaction between treatment and time, $F_{(4,39)} = 0.86$, ns; effect of treatment, $F_{(1,39)} = 0.25$, ns; effect of time, $F_{(4,39)} = 0.86$, ns; for nuclear Arc signal: interaction between treatment and time, $F_{(4,39)} = 2.48$, ns; effect of treatment, $F_{(1,39)} = 4.22$, $p < 0.05$; effect of time, $F_{(4,39)} = 2.48$, ns, followed by post-hoc comparisons (Bonferroni's test). $**p < 0.01$, cocaine group vs saline group; $^{\circ}p < 0.01$, each time point vs 15' group. **(D)** The percentage of Arc-positive nuclei (i.e. above a fixed intensity threshold) has been calculated at each time point after saline or cocaine administration. $n = 6-8$ mice per group; two-way ANOVA: interaction between treatment and time $F_{(4,38)} = 3.90$, $p < 0.01$; effect of treatment, $F_{(1,38)} = 20.49$, $p < 0.001$; effect of time, $F_{(4,38)} = 5.71$, $p < 0.01$ followed by Bonferroni's post-hoc test. $***p < 0.001$; $**p < 0.01$, cocaine group vs saline group; $^{\circ}p < 0.01$; $^{\circ}p < 0.05$, each time point vs 15' group.

(E) Cultured striatal neurons were transfected with GFP (grey) or GFP-Arc (dark) and treated with glutamate $10 \mu\text{M}$ (glu) for 20 minutes to induce phosphorylation of the nuclear kinase MSK-1 (pMSK-1). The intensity of the pMSK-1 labeling was measured in transfected cells

stimulated or not with glutamate. Results are expressed as % increase when compared to control neurons transfected with GFP. $n = 3$ independent experiments per group; two-way ANOVA: interaction between treatment and transfection, $F_{(1,8)} = 6.83$, $p < 0.05$, effect of treatment, $F_{(1,8)} = 19.04$, $p < 0.01$; effect of transfection, $F_{(1,8)} = 2.73$, NS, followed by post-hoc comparisons (Bonferroni's test). $**p < 0.01$, control group (cont) vs glutamate group (glu); $^{\circ}p < 0.05$ GFP vs GFP-Arc plasmid.

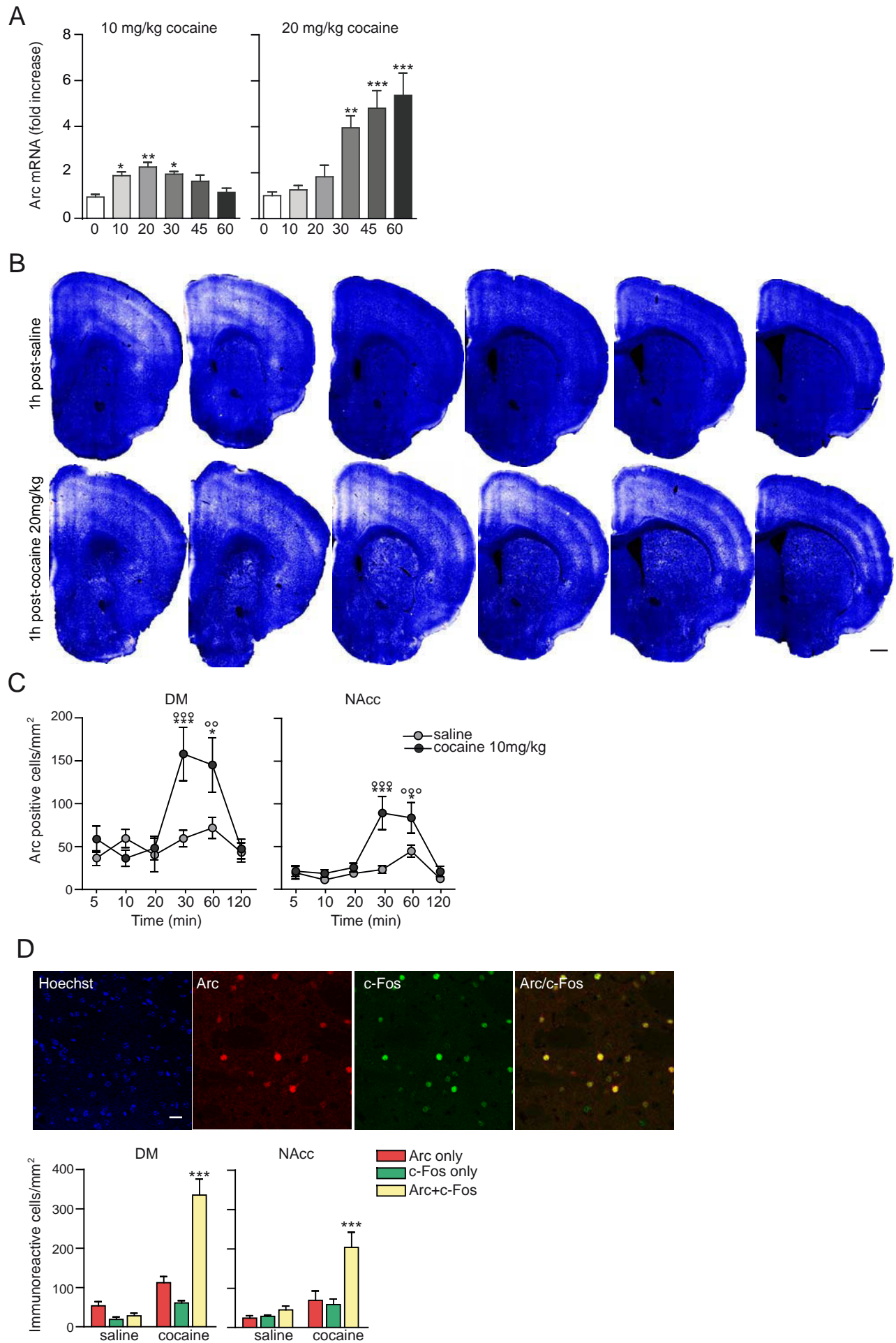
Supplementary figure 3: Cocaine-induced Arc and GFP induction in GFP-Arc mice.

Heterozygous (GFP-Arc^{Het}), homozygous knock-in GFP-Arc (GFP-Arc^{KI}) and corresponding wild type littermate (GFP-Arc^{WT}) were treated with saline or cocaine (20 mg/kg) for 1h and sacrificed to perform immunolabeling of Arc or GFP on distinct brain slices of the same animal. Shown are representative confocal images of Arc (red; top panels) GFP (green; bottom panels) labeling in the DM (scale bar: 30 μ m). Quantifications of Arc (top) or GFP (bottom)-positive cells were performed. $n = 3$ mice per group; two-way ANOVA: for Arc: interaction between treatment and genotype, $F_{(2,7)} = 4.36$, ns; effect of treatment, $F_{(1,7)} = 11.31$, $p < 0.05$; effect of time, $F_{(2,7)} = 17.64$, $p < 0.01$; for GFP: interaction between treatment and genotype, $F_{(2,9)} = 10.36$, $p < 0.01$; effect of treatment, $F_{(1,9)} = 25.31$, $p < 0.001$; effect of time, $F_{(2,9)} = 29.26$, $p < 0.001$, followed by post-hoc comparisons (Bonferroni's test). $**p < 0.01$, $***p < 0.001$ saline group vs cocaine group.

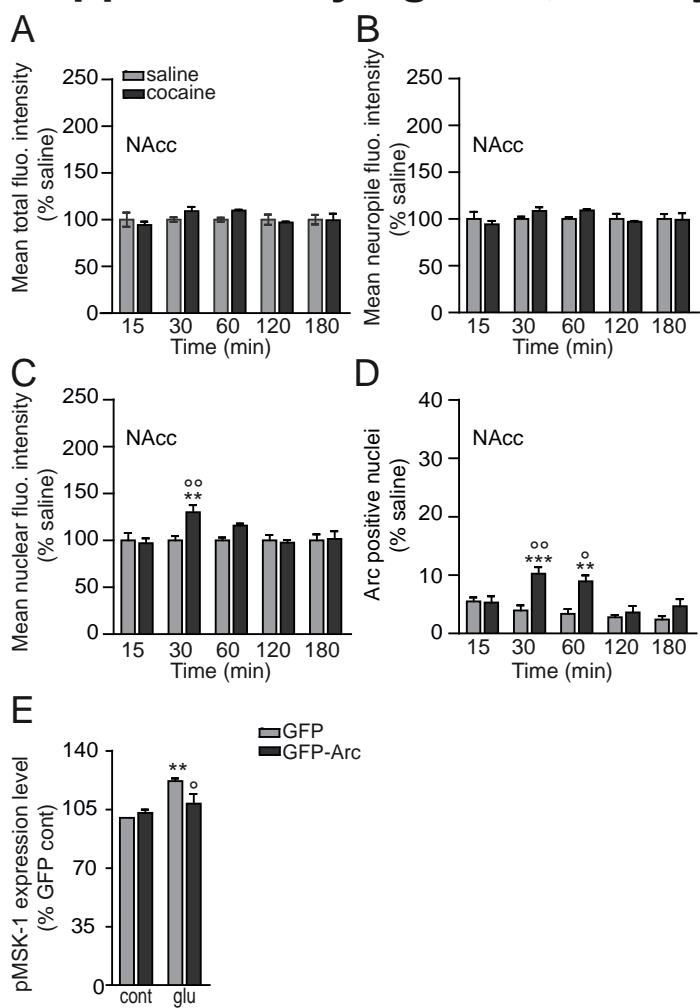
SUPPLEMENTARY REFERENCES

- 1- Wang KH, Majewska A, Schummers J, Farley B, Hu C, Sur M, *et al.* (2006) In vivo two-photon reveals a role of arc in enhancing orientation specificity in visual cortex. *Cell* 126:389-402.
- 2- Besnard A, Bouveyron N, Kappès V, Pascoli V, Pagès C, Heck N, *et al.* (2011) Alterations of molecular and behavioral responses to cocaine by selective inhibition of Elk-1 phosphorylation. *J Neurosci* 31:14296-14307
- 3- Heck N, Betuing S, Vanhoutte P, Caboche J (2012) A deconvolution method to improve automated 3D-analysis of dendritic spines, application to a mouse model of Huntington's disease, *Brain Struct Funct* 217:421-34.
- 4- Ollion J, Cochenne J, Loll F, Escudé C, Boudier T (2013) TANGO : A Generic Tool for High-throughput 3D Image Analysis for Studying Nuclear Organization. *Bioinformatics* first published online May 16, 2013
- 5- Heck N, Dos Santos M, Amairi B, Salery M, Besnard A, Herzog E, *et al.* (2014). A new automated 3D detection of synaptic contacts reveals the formation of cortico-striatal synapses upon cocaine treatment *in vivo*. *Brain Struct Funct*, Jul 8 [epub ahead of print].

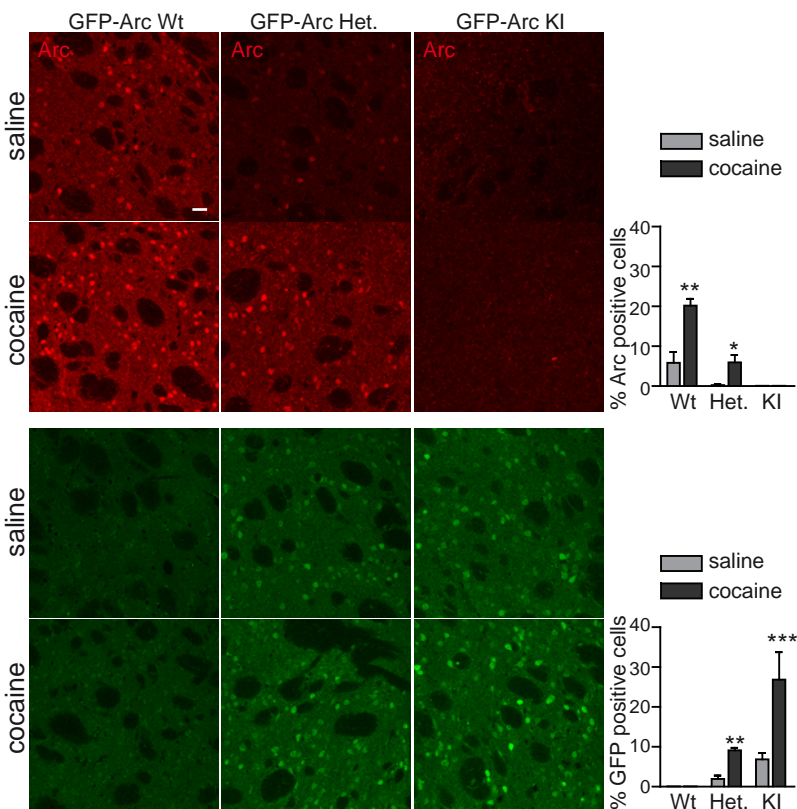
Supplementary figure 1; Sallery et al.



Supplementary figure 2; Sallery et al.



Supplementary figure 3; Sallery et al.



Résultats supplémentaires

Régulation traductionnelle de Arc par le maillon ERK/Mnk-1, implications pour la plasticité structurelle induite par la cocaïne.

1. Contexte

Au cours de ce travail de thèse, les données obtenues concernant l'accumulation de Arc dans le noyau, ont rapidement orienté le projet principal vers l'étude de sa localisation ainsi que ses fonctions dans ce compartiment. Cependant, nos données montrent que l'expression de Arc est également augmentée dans les dendrites suite à l'injection de cocaïne.

Dans l'hippocampe, l'ARNm de Arc est rapidement transporté dans les dendrites en réponse à l'activité synaptique et se localise préférentiellement au niveau des synapses précédemment activées (Steward et al., 1998, Steward and Worley, 2001a). La protéine s'accumule dans les dendrites en réponse à l'induction de différentes formes de plasticité et son expression est essentielle à la consolidation de la plasticité synaptique. Arc régule l'efficacité synaptique au travers de nombreux mécanismes et contribue à la mise en place de la plasticité synaptique fonctionnelle et structurelle. Elle est impliquée dans la régulation de l'endocytose des AMPAR importante pour les processus de régulations homéostatiques de la plasticité neuronale (Chowdhury et al., 2006). Arc participe également à la régulation de la dynamique de l'actine et contribue ainsi aux changements de la morphologie dendritique au cours de l'établissement de la LTP (Messaoudi et al., 2007). L'invalidation génétique totale de l'expression de Arc conduit à des modifications de la densité et de la morphologie des épines dendritiques (Peebles et al., 2010). Ces données issues d'études menées sur des neurones d'hippocampe, n'ont à ce jour pas été reproduite dans le striatum. Elles suggèrent cependant très fortement que le pool dendritique de Arc dans le striatum pourrait être impliquée localement dans la régulation de la plasticité synaptique au sein des MSN.

L'exposition à la cocaïne module l'architecture des réseaux neuronaux au travers notamment de changements de structure de l'arbre dendritique (Russo et al., 2010). Dans le striatum, la cocaïne induit des changements de la morphologie dendritique en modulant la densité et la taille des épines dendritiques (Heck et al., 2014). Dans les MSN, ces changements structuraux dépendent de l'activation de la voie ERK en réponse à la cocaïne (Ren et al., 2010). Des travaux récents de l'équipe ont montré que ces changements morphologiques sont très rapides puisqu'une augmentation du nombre d'épines dendritiques est observée dès une dès 1 heure après une injection unique de cocaïne. Ce travail s'inscrit dans le projet de thèse de Marc Dos Santos, dont l'un des objectifs est d'élucider les mécanismes moléculaires qui sous-tendent ces changements morphologiques rapides dans le MSN.

Nous avons émis l'hypothèse que la protéine Arc rapidement induite dans les dendrites pourrait être impliquée dans ces modifications rapides de la morphologie des MSN en réponse à la cocaïne. La synthèse rapide et locale de la protéine Arc est régulée en aval de différentes voies de signalisation régulant la machinerie traductionnelle (Bramham, 2008). Comme nous l'avons vu précédemment, la voie ERK est impliquée dans la régulation de Arc, au niveau traductionnel, par l'intermédiaire d'un de ses substrats cytoplasmiques, la protéine Mnk-1 (Panja et al., 2009). Dans l'hippocampe, en réponse à l'induction d'une LTP, la protéine Mnk-1 directement phosphorylée par ERK, phosphoryle en retour le facteur d'élongation de la traduction, eIF4E. L'activation du maillon ERK/Mnk-1 est requise pour l'établissement de la LTP ainsi que pour l'induction de Arc dans ce protocole (Panja et al., 2009). Cette régulation de l'expression de Arc s'exerce au niveau traductionnel puisque l'inactivation de Mnk-1 conduit à une perte d'expression de la protéine sans altérer l'induction des messagers (Panja et al., 2009). Nous avons envisagé que cette voie de régulation rapide de Arc pourrait être mise en jeu dans le striatum et jouer un rôle dans la genèse d'épines dendritiques rapide que nous avons mise en évidence après une injection de cocaïne. Etant donné le rôle de Arc dans la plasticité structurelle, ce mécanisme pourrait en effet rendre compte de l'influence de la voie ERK sur la structure et le nombre des épines dendrites des MSN. En collaboration avec Marc Dos Santos, nous avons analysé la régulation de la protéine Mnk-1 dans les neurones striataux et l'implication du maillon ERK/Mnk-1 dans la régulation de la morphologie des épines dendritiques en réponse à la cocaïne.

2. Résultats

a. Modèle in vivo d'injection unique de cocaïne

Dans un premier volet de cette étude, j'ai analysé l'effet de la cocaïne sur le niveau de phosphorylation de la protéine Mnk-1 dans le striatum de souris. J'ai montré que la phosphorylation de Mnk-1 (P-Mnk-1, Thréonine 197/202) est augmentée de manière rapide et transitoire dans les neurones striataux en réponse à une injection de cocaïne à 20 mg/kg. **(Figure 20A)** Cette activation de Mnk-1 survient dès 5 minutes après l'injection de cocaïne et revient à son niveau basal après 30 minutes **(Figure 20B)**. Afin de déterminer si ERK est impliqué dans l'activation de Mnk-1, j'ai étudié l'effet du SL327, un inhibiteur de MEK. L'administration du SL327 abolit totalement l'activation de Mnk-1 par la cocaïne démontrant que celle-ci dépend de l'activation de la voie ERK. Accord avec l'implication de ERK, mes observations montrent que Mnk-1 et ERK sont activées dans la même sous-population neuronale du striatum **(Figure 21)**.

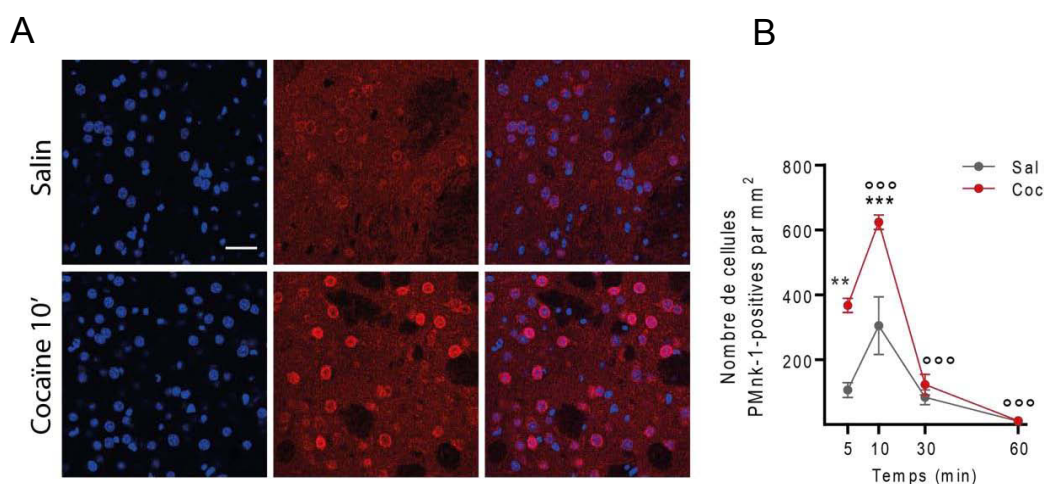


Figure 20 : Cinétique d'activation de Mnk-1 en réponse à la cocaïne

(A) Images confocales illustratives du marquage de la protéine Mnk-1, sous sa forme phosphorylée (P-Mnk-1, Thr^{197/202}), 10 minutes après une injection de solution saline (haut) ou de cocaïne (20 mg/kg) (bas). (B) Quantification du nombre de cellules P-Mnk-1 positives aux temps indiqués après une injection de solution saline ou de cocaïne (20 mg/kg). Données +/- SEM, n=4 ; effet du traitement, **p<0.01, ***p<0.001 ; effet du temps °°°p<0.001. Barre d'échelle : 50µM

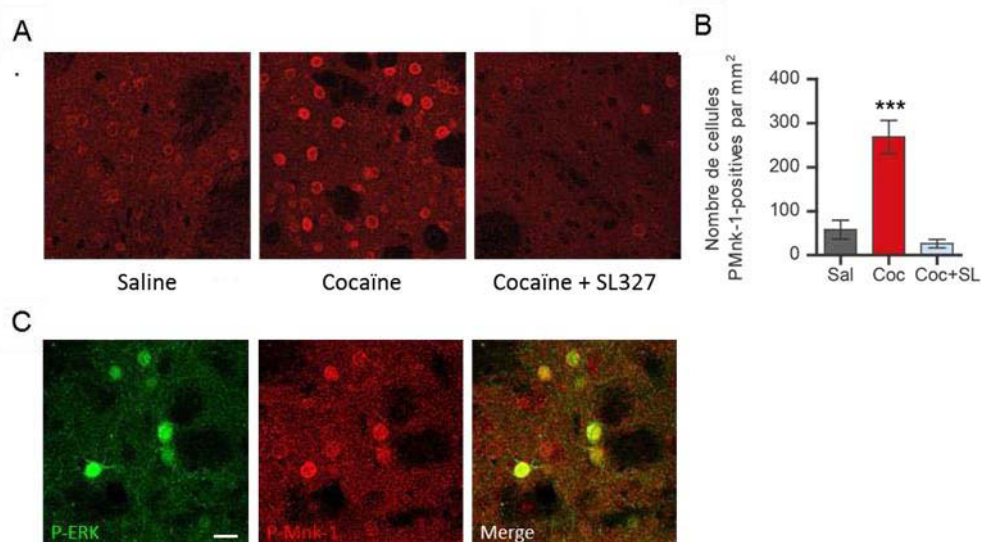


Figure 21: Rôle de ERK dans l'activation de la protéine Mnk-1

(A) Images confocales illustratives du marquage de la protéine Mnk-1 sous sa forme phosphorylée (P-Mnk-1, Thr^{197/202}), 10 minutes après une injection de solution saline ou de cocaïne chez des animaux prétraités avec le véhicule ou du SL327 (50 mg/kg). (B) Quantification du nombre de cellules P-Mnk-1 positives aux temps indiqués après une injection de solution saline ou de cocaïne (20 mg/kg) chez des animaux prétraités avec le véhicule ou du SL327 (50 mg/kg). Données +/- SEM, n=4 ; effet du traitement, ***p<0.001. Barre d'échelle : (A) 50µM, (B) 30µM

b. Activation in vitro du maillon pMnk-1/pelF4E

Dans un modèle *in vitro*, de cultures primaires de neurones striataux, la protéine Mnk-1 est activée par une co-stimulation pharmacologique des D1R et NMDAR (3 µM de glutamate en présence de 10 µM SKF38393 : stimulation G+S (**Figure 22 A**). Ce protocole est adapté d'un modèle *in vitro* de stimulation des neurones striataux, précédemment développé dans notre équipe, qui permet *in vitro*, de récapituler un certain nombre des réponses moléculaires induite par l'injection de cocaïne *in vivo* (Pascoli et al., 2011) Suite à son activation, pMnk-1 phosphoryle le facteur d'élongation de la traduction eIF4E (Knauf et al., 2001, Ueda et al., 2004b). L'administration du CGP57380, un inhibiteur de Mnk-1, conduit à une perte de l'augmentation de la phosphorylation d'eIF4E en aval de l'activation de Mnk-1 (Panja et al., 2009) L'application de ce composé dans les cultures primaires de MSN, diminue la phosphorylation d'eIF4E par la stimulation G+S (**Figure 22B**).

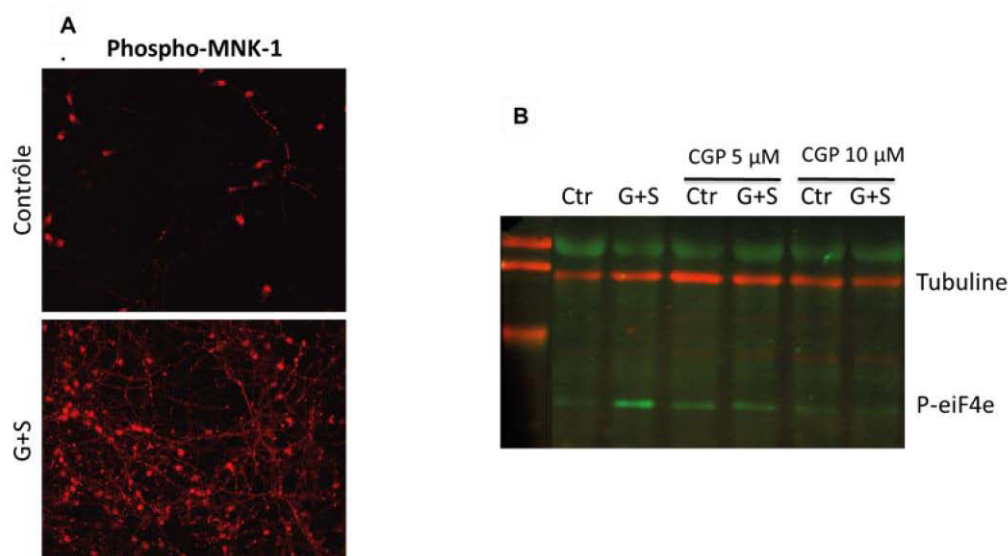


Figure 22: Activation du maillon pMnk-1/pelF4E dans un modèle *in vitro* de culture de neurones striataux

(A) Images illustratives prises en épifluorescence du marquage de la protéine Mnk-1, sous sa forme phosphorylée (P-Mnk-1, Thr^{197/202}), dans des neurones striataux en culture 10 minutes après une stimulation contrôle (gauche) ou G+S (droite). (B) Détection par Western-Blot de la forme phosphorylée de la protéine eIF4E (Ser²⁰⁹) en réponse à une stimulation contrôle ou G+S avec ou sans prétraitement par le CGP57380 aux doses indiquées.

c. Modèle *ex vivo* (coll. Marc Dos Santos)

Cette partie du projet a été réalisée en collaboration avec Marc Dos Santos dans un modèle *ex-vivo* de tranches striatales obtenues à partir de cerveaux de souris adultes. Dans ce modèle, l'effet de la cocaïne est mimé par une stimulation G+S, identique à celle utilisée *in vitro*. L'application de cette stimulation permet de reproduire l'activation de ERK observée *in vivo* en réponse à la cocaïne. Les travaux de Marc Dos Santos ont également montré que cette stimulation reproduit *ex vivo* la pousse d'épine dendritiques rapide comme observé *in vivo* dans les MSN 1 heure après l'exposition à la cocaïne. Dans ce modèle, la protéine Mnk-1 est activée 20 minutes après l'application de la co-stimulation G+S (**Figure 23**). Nous avons ensuite souhaité analyser l'implication du maillon cytoplasmique ERK/Mnk-1 sur les changements de morphologie dendritique induits par la cocaïne. Les neurones sont marqués de manière stochastique par un colorant lipophile, le DyI puis visualisés en microscopie confocale à fort grossissement (Heck et al., 2012, Heck et al., 2014). L'application du CGP57380 inhibe l'augmentation de la densité d'épines dendritiques induite par la stimulation G+ S (**Figure 24**) démontrant l'importance de l'activation de Mkn-1 dans les changements morphologiques.

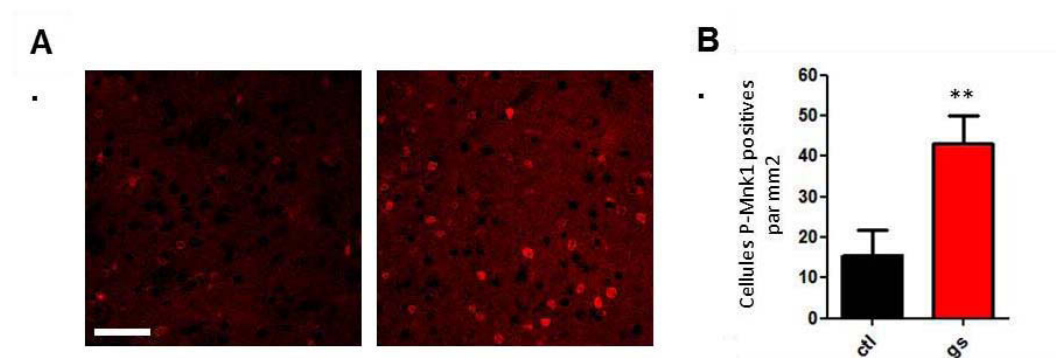


Figure 23: Activation de pMnk-1 dans un modèle ex vivo de tranches de striatum
 (A) Images illustratives du marquage de la protéine Mnk-1, sous sa forme phosphorylée (P-Mnk-1, Thr^{197/202}) dans des tranches de striatum, 20 minutes après une stimulation par le DMSO ou de type G+S. (B) Quantification du nombre de cellules P-Mnk-1 20 minutes après une stimulation par le DMSO ou de type G+S. . Données +/- SEM, n=4; effet du traitement, **p<0.01. Barre d'échelle : 10µM

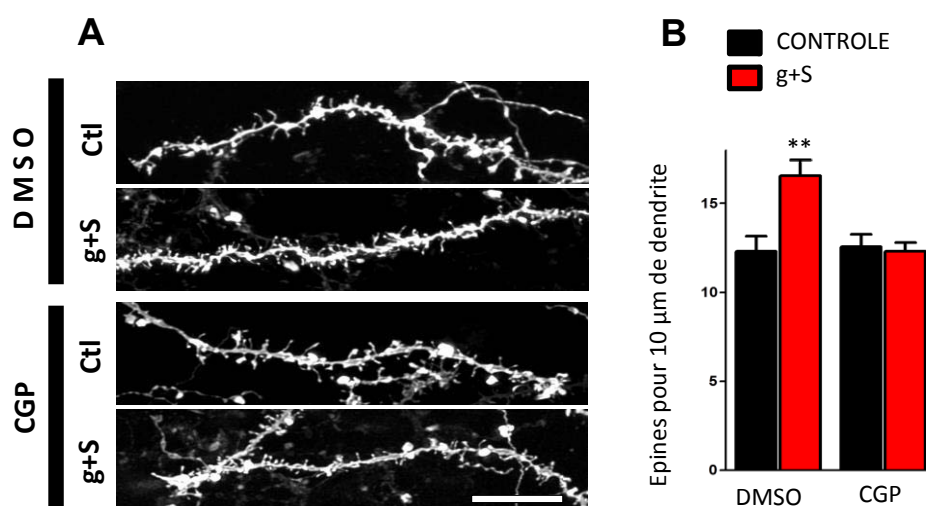


Figure 24: Effet de l'inhibition de pMnk-1 sur l'augmentation de la densité d'épines dendritiques induite par une stimulation G+S

(A) Projection maximale d'un empilement d'images confocales d'un fragment dendritique visualisé par un marquage au DyeI 20 minutes après une incubation en absence (contrôle) ou présence de la co-stimulation G+S sur des tranches prétraitées au CGP57380 ou au DMSO. (B) Quantification de la densité d'épines dendritiques 20 minutes après une stimulation par le DMSO ou de type G+S sur des tranches prétraitées au CGP57380 (ou au DMSO. Données +/- SEM (n=3) *p<0.05. Barre d'échelle : 10 µm

Cette étude montre pour la première fois que la protéine Mnk-1 est activée *in vivo* en réponse à la cocaïne en aval de l'activation de ERK. Les données obtenues *in vitro* indiquent que Mnk-1 est impliquée dans la phosphorylation d'eIF4E en réponse à une stimulation par le

glutamate et le composé CGP57380 utilisé à 10 μ m inhibe effectivement l'activité de Mnk-1. Il serait intéressant d'analyser l'effet de la cocaïne sur la phosphorylation d'eIF4E *in vivo* et d'établir le rôle de Mnk-1 dans ce mécanisme. Nos données suggèrent très fortement que la voie ERK est impliquée dans des régulations traductionnelles au travers de l'activation de la kinase Mnk-1. Les données obtenues dans le modèle de tranches aiguës de striatum montre que l'activation de cette voie est importante pour les changements morphologiques rapides induits par la co-stimulation des DIR et des récepteurs au glutamate. *In vivo*, l'activation de Mnk-1 en aval de ERK pourrait ainsi jouer un rôle central dans la pousse et le remodelage des épines dendritiques observé en réponse à la cocaïne. Etant donné le rôle de ce module dans la régulation de l'expression de Arc dans l'hippocampe, il serait intéressant d'analyser l'effet de l'inhibition de Mnk-1 sur les réponses morphologiques induites par la cocaïne. Cette étude suggère donc l'implication d'un substrat cytoplasmique de ERK dans la régulation de la plasticité structurelle induite par les drogues. Cette voie de régulation indépendante de la transcription pourrait rendre compte de l'implication de ERK dans des processus cellulaires rapides importants pour la mise en place de la plasticité synaptique.

DISCUSSION ET PERSPECTIVES

DISCUSSION ET PERSPECTIVES

La protéine Arc joue un rôle central dans les processus de plasticité neuronale qui sous-tendent l'apprentissage et la mémoire (Shepherd and Bear, 2011). Cet IEG, induit dans de nombreux paradigmes comportementaux, est essentiel pour la mise en place de la plasticité synaptique à long terme et la consolidation de la mémoire. S'il a été montré que l'expression de Arc est augmentée dans le striatum et le cortex en réponse à la cocaïne, les mécanismes impliqués dans sa régulation ainsi que son implication dans les adaptations neuronales induites par cette drogue d'abus restent peu documentés.

Mon travail de thèse visait à caractériser précisément le profil et les modalités de l'induction de Arc par la cocaïne dans le striatum et étudier son rôle dans les réponses moléculaires et comportementales induites par cette drogue. Dans un premier volet de cette étude, j'ai analysé le profil d'induction de Arc en réponse à l'administration de cocaïne ainsi que les voies de signalisation impliquées au sein des MSN. Notre étude a montré que l'expression de Arc est augmentée rapidement et transitoirement dans le striatum après une injection unique de cocaïne. J'ai également établi que cette induction dépend de la stimulation concomitante des D1R et NMDAR ainsi que de l'activation de la voie ERK. De manière inattendue, l'analyse de la localisation subcellulaire de la protéine Arc a révélé que la cocaïne induit une accumulation rapide et massive de Arc dans le compartiment nucléaire des MSN. Au sein du noyau, Arc est exprimée dans les zones actives de transcription où elle est colocalisée avec les histones H3 sous leur forme phosphorylée (pH3). *In vitro*, dans des cultures de MSN, j'ai montré que la surexpression de Arc diminue la phosphorylation des histones H3 induite par le glutamate indiquant qu'elle réprime des mécanismes épigénétiques induits par l'activité neuronale. Enfin, l'utilisation d'un modèle génétique d'inactivation de *Arc*, les souris knock-in Arc-d2EGFP, m'a permis d'établir que l'abolition de l'expression de Arc entraîne une décompaction de la chromatine associée à une augmentation de l'activité de la RNA Pol-II. La perte d'expression de Arc rend les animaux hypersensibles à la cocaïne et favorise le développement d'altérations comportementales à long terme induites par de faibles doses de cocaïne (**Figure 25**).

Ce travail apporte la première démonstration d'un impact de la cocaïne sur l'adressage de Arc vers le noyau. L'entrée massive et rapide de la protéine dans ce compartiment suggère qu'elle est impliquée dans des événements nucléaires induits par la cocaïne, un rôle qui n'avait jamais

été envisagé à ce jour dans le contexte des réponses aux drogues. L'ensemble des données obtenues *in vivo* et *in vitro* indiquent effectivement que l'expression de Arc influence l'organisation de la chromatine et la transcription. Enfin, ce travail permet d'établir un rôle de Arc dans les réponses comportementales induites par la cocaïne en démontrant que son expression tend à limiter le développement de la sensibilisation locomotrice. L'ensemble de nos résultats indique que l'induction rapide et transitoire de Arc dans le noyau contribue au remodelage de la chromatine et aux réponses moléculaires et comportementales induites par la cocaïne. Nos données sont en faveur d'un rôle répresseur de Arc sur ces réponses et suggèrent qu'elle participe à une forme de plasticité homéostatique en réponse à l'exposition à la cocaïne.

1. Régulation de l'expression de Arc par la cocaïne

Le premier volet de ce travail a apporté de nouvelles données concernant le profil spatio-temporel d'expression de Arc dans le striatum suite à une injection de cocaïne. La caractérisation précise de l'induction de Arc par la cocaïne est une étape importante dans la compréhension de son rôle dans les réponses à cette drogue. La cinétique et la localisation de cette induction sont en effet porteuses d'informations quant aux réseaux neuronaux et aux mécanismes cellulaires dans lesquels Arc est impliquée.

a. Localisation et cinétique d'induction de la protéine Arc dans le striatum

L'influence de la cocaïne sur l'expression de Arc a été rapportée au travers d'études menées chez le rat (Fosnaugh et al., 1995, Fumagalli et al., 2006). Ces travaux montrent que la cocaïne induit une augmentation de l'expression de la protéine et des messagers dans le striatum, le cortex préfrontal et dans une moindre mesure dans l'hippocampe. La détection des protéines Arc par Western-blot n'apporte cependant pas d'informations quant à leur localisation au sein de ces régions cérébrales. Nos résultats, obtenus par immunohistochimie, montrent que l'expression de Arc est augmentée dans les régions ventrales et dorsales du striatum en réponse à l'injection de cocaïne. Nous observons que la protéine Arc est majoritairement induite dans les régions médianes du striatum dorsal, et ce plus fortement que dans le NAcc. Son expression est maximale dans les régions antérieures du DM et du NAcc et diminue dans la portion la plus postérieure. Bien que ce soit peu discuté par les auteurs, les

données de Fosnaugh et ses collaborateurs, obtenues par hybridation *in situ*, révèlent une forte expression des ARNm dans le striatum dorso-médian, qui est en accord avec nos observations (Fosnaugh et al., 1995).

Ce travail m'a également permis d'établir la cinétique précise d'induction de Arc dans le striatum, en réponse à la cocaïne. Suite à l'injection de drogue, nous observons une augmentation rapide et transitoire des messagers et de la protéine. Cette fenêtre d'induction restreinte est en accord avec la régulation extrêmement fine de l'expression de Arc en réponse aux changements d'activité neuronale (Lyford et al., 1995, Shepherd and Bear, 2011).

Nos données indiquent que la transcription de *arc* est activée dans des délais très courts suite à l'administration intrapéritonéale de cocaïne. Si l'augmentation des ARNm est significative à partir de 30 minutes, nous avons observé qu'ils tendent à augmenter dès 15 minutes. A une dose de 10 mg/kg, les ARNm sont significativement augmentés dès 10 minutes, suggérant que la dose de cocaïne n'impacte pas uniquement l'amplitude mais également la cinétique d'induction. Ces données sont en accord avec les observations faites dans d'autres modèles, notamment dans l'hippocampe où les ARNm sont détectés dès 15 minutes après l'exposition à un nouvel environnement (Guzowski et al., 1999, Ramirez-Amaya et al., 2006). Si une induction rapide est la caractéristique commune à tous les IEG, certains d'entre eux, dont *arc*, s'avèrent particulièrement sensibles à l'activité synaptique et sont dits « IEG rapides ». Les résultats que nous obtenons reflètent cette caractéristique de *arc*. Un mécanisme a été proposé pour rendre compte de la transcription extrêmement rapide ces IEG dits « rapides ». Pour ces gènes, la polymérase est positionnée de manière constitutive à proximité du promoteur et peut ainsi être recrutée de manière extrêmement rapide en réponse à l'activité neuronale (Saha et al., 2011). L'initiation de la transcription, via le recrutement de la RNA Pol-II, étant une étape limitante de la transcription, ces gènes dits « rapides » sont induits plus précocement que d'autres gènes régulés par l'activité neuronale. Dans le cas des gènes « rapides » qui codent pour des facteurs de transcription, les auteurs proposent que ce mécanisme leur permette d'être induits en amont d'autres gènes afin de pouvoir en contrôler l'expression (Saha et al., 2011). Concernant, *arc*, les auteurs proposent que ce mécanisme sous-tende le transport rapide de ces ARNm vers les dendrites. A la lumière de nos données, et notamment la rapide accumulation de Arc au noyau, ce mécanisme d'induction précoce du gène, pourrait rendre compte de la capacité de la protéine Arc à réguler d'autres gènes induits plus tardivement.

Notre étude montre également que la fenêtre temporelle d'expression de Arc par la cocaïne est fortement restreinte. Le pic d'expression des messagers et de la protéine est très transitoire et rapidement suivi d'un retour au niveau basal indiquant une régulation active de leur dégradation. Ce phénomène s'explique notamment par les différents mécanismes de dégradation dépendants de l'activité qui sont impliqués dans la régulation de Arc. Nous avons vu précédemment que le mécanisme du NMD (Giorgi et al., 2007) ainsi que l'adressage de la protéine vers le protéasome (Mabb et al., 2014) sont importants pour le contrôle spatio-temporel de l'induction de Arc en réponse à l'activité synaptique. Si ces mécanismes n'ont pas été décrits dans les neurones striataux, il est fortement envisageable qu'ils soient mis en jeu et sous-tendent l'induction transitoire de Arc en réponse aux drogues.

b. Voies de signalisation impliquées dans l'induction de Arc par la cocaïne dans le striatum

S'il a été montré que la stimulation des récepteurs dopaminergiques joue un rôle important dans la régulation de Arc (Fumagalli et al., 2006), les voies de signalisation responsable de l'induction de Arc par la cocaïne demeurent inconnues. L'administration d'un antagoniste des D1R bloque l'induction des ARNm de Arc par la cocaïne (Fosnaugh et al., 1995, Fumagalli et al., 2006). Nos résultats confirment ces données et montrent également que cette induction est strictement dépendante de la stimulation des NMDAR. La régulation de Arc par la cocaïne dépend donc de la convergence des signaux intracellulaires en aval des afférences dopaminergiques et glutamatergiques. La voie ERK joue un rôle important dans l'intégration de ces signaux dans les MSN et son activation est impliquée dans l'induction de nombreux IEG en réponse à la cocaïne (Girault et al., 2007, Cahill et al., 2014a, Pascoli et al., 2014). Nous montrons que cette voie est nécessaire à l'induction de Arc par la cocaïne aux niveaux transcriptionnel et traductionnel. Ces résultats corroborent les données obtenues dans l'hippocampe où l'activation de la voie ERK contrôle l'induction de Arc dans des protocoles d'induction d'une LTP (Waltereit et al., 2001, Chotiner et al., 2010). L'implication de ERK est cohérente au vu de la composition du promoteur de *arc* et notamment la présence de deux éléments de régulation de type SRE (Serum Response Element). La mutation d'un des sites SRE du promoteur de *arc* abolit la phase tardive de la LTD dans le cervelet indiquant que l'activation transcriptionnelle de *arc* en aval de ces sites de régulation est essentielle pour la mise en place de la plasticité neuronale (Smith-Hicks et al., 2010). L'activation de la

transcription au niveau des sites SRE dépend de la fixation d'un complexe formé de deux molécules de SRF associées à un TCF tel que Elk-1. La phosphorylation de Elk-1 par ERK est nécessaire et suffisante à l'activation de la transcription dépendante des sites SRE (Lavaur et al., 2007). Une étude récente menée par notre équipe a montré que l'inhibition spécifique de Elk-1 en aval de ERK diminue l'induction des ARNm de Arc par la cocaïne (Besnard et al., 2011). Nos données démontrent donc l'importance du maillon ERK-Elk-1 dans l'activation transcriptionnelle de *arc*.

Les données obtenues au cours de ce travail de thèse, suggèrent que ERK pourrait également réguler l'expression de *arc* en aval de la transcription SRE-dépendante, via la kinase Mnk1. Cette protéine est une cible directe de ERK et participe à la régulation de la synthèse protéique via la phosphorylation du facteur d'élongation de la traduction, eIF4E. L'activation de Mnk1 en aval de ERK est requise pour l'induction de la LTP dans l'hippocampe (Panja et al., 2009). Mes travaux montrent pour la première fois que Mnk1 est activée par la cocaïne dans le striatum en aval de ERK suggérant que ce substrat cytoplasmique de ERK pourrait jouer un rôle dans les réponses à la cocaïne. Ce contrôle de l'expression de Arc par le maillon ERK/Mnk1 s'exerce au niveau traductionnel uniquement puisque l'inhibition de Mnk1 n'altère pas l'induction des ARNm (Panja et al., 2009). L'ensemble de ces données suggère que le maillon cytoplasmique ERK/Mnk1 pourrait moduler la traduction rapide de Arc en réponse à la cocaïne. Cette voie de régulation apparaît également comme un mécanisme par lequel ERK promeut une induction rapide et massive de Arc en coordonnant les activités transcriptionnelle et traductionnelle.

2. Localisation nucléaire de Arc

Notre étude démontre pour la première fois que la cocaïne induit une accumulation importante de la protéine Arc dans le noyau des neurones striataux. Nous observons également une augmentation de son expression dans le compartiment dendritique où son induction semble plus modérée. L'intensité de cette augmentation est établie dans chaque compartiment par comparaison avec l'effet d'une injection de solution saline. Si l'induction de la protéine s'avère moins conséquente dans les dendrites, il n'est pour autant pas possible de conclure à une implication moins grande du pool dendritique dans les réponses à la cocaïne. Arc prend part à différents mécanismes cellulaires importants pour la régulation locale de la plasticité

synaptique (Bramham, 2008). Bien que ces mécanismes n'aient pas été décrits dans les neurones striataux, nos observations, et notamment la présence de Arc dans les épines dendritiques sont en faveur d'un rôle local de la protéine dans les dendrites des MSN. De la même manière la régulation du transport des ARNm et de la traduction locale de la protéine Arc, décrits dans d'autres structures, n'ont pas été mis en évidence dans les neurones du striatum.

Dans le compartiment nucléaire, l'expression de la protéine est très fortement augmentée en réponse à l'injection de cocaïne. Ce résultat apporte de nombreuses perspectives nouvelles quant au rôle de Arc dans la plasticité neuronale et soulève également de nombreuses questions concernant ses partenaires et fonctions au sein du noyau où son rôle reste peu étudié à ce jour. Dès sa première description en 1995, Arc s'est démarquée des autres IEG par sa localisation dendritique. La grande majorité des IEG décrits à cette époque codaient des facteurs de transcription qui sont, par définition, très majoritairement localisés dans le noyau des neurones. L'originalité que représentait la présence de Arc dans les dendrites et les épines dendritiques a rapidement suscité un vif intérêt. L'hypothèse s'est imposée selon laquelle Arc, rapidement induite par l'activité neuronale, pourrait agir en retour en modulant localement l'efficacité synaptique au sein du compartiment dendritique. En parallèle des nombreux travaux visant à identifier les fonctions synaptiques de Arc, sa présence et son rôle dans le compartiment nucléaire sont restés très peu étudiés. Notre étude démontre que la présence de Arc dans le noyau est dépendante de l'activation des neurones striataux et suggère fortement qu'elle régule des fonctions nucléaires importantes pour la mise en place de la plasticité neuronale induite par la cocaïne. L'entrée rapide de Arc dans le noyau en réponse à l'activation des MSN soit par le glutamate *in vitro*, soit par la cocaïne *in vivo*, soulève différentes questions quant aux mécanismes impliqués dans sa localisation nucléaire.

a. Mécanismes d'adressage de Arc vers le noyau

Le transport des protéines vers le noyau se fait au travers des pores nucléaires soit par diffusion passive pour les petites protéines soit par transport actif pour les plus imposantes. La taille de Arc est compatible avec une diffusion passive, cependant, la rapidité de son accumulation nucléaire suggère fortement un transport actif. Ce type de transport dépend de séquences d'adressage présentes dans la séquence de la protéine qui vont permettre sa prise en charge par les complexes protéiques impliqués dans l'import ou l'export nucléaire. Nous

avons vu précédemment qu'une étude menée récemment par le groupe du Pr Finkbeiner a montré l'existence de trois séquences régulatrices au sein de la protéine qui gouvernent sa localisation nucléaire (Korb et al., 2013). Ces séquences de type Pat7 NLS, NES et NRD régulent respectivement l'import, l'export et la rétention de la protéine dans le noyau. Les cinétiques rapides d'entrée au noyau que nous observons *in vivo* en réponse à la cocaïne sont compatibles avec un transport actif via ces différentes séquences régulatrices. Le transport de Arc vers le noyau pourrait également dépendre de sa liaison à des protéines cargo. En accord avec cette hypothèse, une étude menée dans des lignées cellulaires a montré que la protéine Amida, qui est impliquée dans l'apoptose, se lie à Arc et promeut sa localisation nucléaire (Irie et al., 2000). Amida est exprimée dans le SNC et il a été proposé que Arc puisse contribuer aux fonctions de cette protéine dans l'apoptose. Il n'existe, cependant, à ce jour aucune démonstration d'une association entre ces deux protéines dans un modèle neuronal.

b. Stimuli impliqués dans la localisation nucléaire de Arc

L'accumulation nucléaire rapide que nous observons survient en réponse à une stimulation des neurones soit par le glutamate *in vitro*, soit par la cocaïne *in vivo*. L'étude de Finkbeiner a montré que le transport de Arc vers le noyau dépend de l'activation des voies de signalisation MEK-ERK, et PLC en réponse au BDNF (Korb et al., 2013). Dans nos deux modèles, il est envisageable que l'activation de la voie ERK soit impliquée dans la régulation du trafic nucléaire de Arc. Il est cependant difficile de répondre à cette question *in vivo* puisque l'activation de la voie ERK contrôle l'induction de la protéine. Il serait en revanche possible d'étudier l'implication de ERK *in vitro*, dans un modèle de transfection de MSN en culture tel que celui que nous avons utilisé et dans lequel la protéine Arc fusionnée à la GFP serait exprimée indépendamment de l'activité de ERK. Dans ce cas, l'application d'un inhibiteur de ERK avant le traitement par le glutamate permettrait d'évaluer le rôle de ERK dans la translocation nucléaire de la protéine. Bien qu'informatives, ces expériences n'ont pas été réalisées car notre étude étant majoritairement centrée sur la caractérisation du rôle de Arc en aval de ERK *in vivo* dans le contexte d'une exposition à la cocaïne. Il est envisageable également que des modifications post-traductionnelles de la protéine soient engagées dans sa translocation nucléaire. Des observations issues du groupe du Pr. Bramham indiquent que la sumoylation de Arc diminue sa localisation nucléaire et augmente son expression dans la fraction cytoplasmique associée au cytosquelette (Bramham et al., 2010). Ces observations

évoquées dans une revue restent non publiées à ce jour et aucun mécanisme précis n'est proposé pour expliquer le lien entre la sumoylation de la protéine et son trafic nucléaire.

Si l'expression nucléaire de Arc augmente rapidement après l'injection de cocaïne, elle s'est également révélée très transitoire et revient à son niveau basal rapidement après son pic d'induction. Le transport de Arc hors du noyau n'est pas associé à une relocalisation cytoplasmique puisque la diminution de l'expression nucléaire est synchrone avec la diminution de l'expression totale de la protéine. Cette diminution dépend donc très certainement des mécanismes de dégradation de la protéine. Certains mécanismes de dégradation ont été décrits dans le compartiment nucléaire et il est donc pas possible d'exclure totalement que la protéine soit dégradée en partie dans le noyau. La voie canonique de dégradation des protéines est cependant majoritairement cytoplasmique et l'export nucléaire de Arc semble un prérequis important à sa dégradation. Etant donnée la finesse de la régulation de l'expression de Arc à de multiples étapes, il est envisageable que son export soit également soumis à un contrôle étroitement lié à l'activité neuronale. Sa rétention ainsi que son transport à l'extérieur du noyau par des mécanismes régulés par l'activité synaptiques pourraient ainsi contribuer à un contrôle fin de sa fenêtre d'induction nucléaire. Ceci semble critique pour la régulation de ses fonctions au sein du noyau et notamment la restriction temporelle de son activité dans ce compartiment.

3. Fonctions nucléaires de Arc

La localisation nucléaire de Arc soulève de nombreuses questions quant à sa fonction dans ce compartiment. De nombreux IEG localisés dans le noyau agissent en tant que facteur de transcription. Cependant, comme nous l'avons vu précédemment, il semble peu probable que Arc exerce une telle fonction, du fait, notamment, de ses propriétés biochimiques qui ne sont pas favorables à une interaction directe avec l'ADN ([Lyford et al., 1995](#)). Bien que n'agissant pas en tant que facteur de transcription, Arc pourrait tout de même participer à des régulations transcriptionnelles au travers d'autres mécanismes cellulaires. En effet, de nombreux arguments sont en faveur de son implication dans la régulation de l'expression des gènes. Tout d'abord, dans notre modèle, l'expression de Arc est maximale dans le noyau entre 30 minutes et 60 minutes après l'injection de cocaïne qui représente une fenêtre de temps associée à l'activation transcriptionnelle de nombreux IEG en réponse à la cocaïne. Ensuite,

nous avons montré que la protéine se localise dans des zones actives de la transcription à proximité des histones H3 sous leur forme phosphorylée qui sont des marqueurs d'activation de la chromatine. L'ensemble de ces données indique que le profil spatio-temporel de l'expression nucléaire de Arc est étroitement corrélé avec l'activation transcriptionnelle. D'un point de vue fonctionnel, nous avons pu établir une corrélation entre l'expression de Arc et le niveau de phosphorylation des histones H3 ainsi que de l'activité de la RNA-PolIII, deux protéines impliquées dans la régulation de l'activité transcriptionnelle. Nos résultats sont en accord avec les travaux de Korb et ses collaborateurs qui ont également démontré l'influence de l'expression nucléaire de Arc sur l'expression génique et notamment l'expression de gènes porteurs de sites CRE dans leurs promoteurs (Korb et al., 2013). L'ensemble de ces données apporte de nombreux arguments saillants en faveur de l'implication de Arc dans les régulations géniques et pose la question de son mécanisme d'action au sein de ces processus.

a. Arc et la phosphorylation des histones H3, vers une régulation de mécanismes épigénétiques ?

Du fait de sa proximité avec les histones H3 phosphorylées, nous avons émis l'hypothèse selon laquelle Arc influencerait les mécanismes transcriptionnels au travers de régulations épigénétiques. De manière intéressante, nos résultats montrent que Arc exerce un contrôle inhibiteur sur la phosphorylation des histones H3 au niveau de leurs résidus Ser¹⁰. *In vivo*, nous avons vu que Arc est localisée à proximité des histones H3 suggérant qu'elle pourrait interagir avec les protéines qui régulent la phosphorylation des histones. L'activation de la kinase MSK-1, qui est majoritairement impliquée dans ce processus (Brami-Cherrier et al., 2005), est également diminuée lorsque la protéine Arc est surexprimée au noyau après transfection d'une construction GFP-Arc et stimulation des neurones par le glutamate. En amont de MSK-1, la phosphorylation de ERK ainsi que sa translocation nucléaire ne sont en revanche pas altérées par la surexpression de Arc. L'influence de Arc sur la phosphorylation de H3 n'est donc pas dépendante d'une inhibition globale de la voie ERK mais d'un mécanisme nucléaire qui interfère avec l'activation de MSK-1 et la phosphorylation des histones. Nos données ne permettent cependant pas de conclure quant au mécanisme par lequel Arc diminue le niveau de phosphorylation des histones H3. Il est important de noter que l'impact de la surexpression de Arc sur la phosphorylation de MSK-1 reste modeste en comparaison de l'effet inhibiteur très net exercé sur la phosphorylation des histones H3. Ceci

suggère que l'action de Arc sur les histones implique probablement des mécanismes moléculaires additionnels à l'inhibition de l'activité de MSK-1. La phosphorylation des histones H3 est également régulée par les phosphatases et notamment la protéine PP-1. Une autre hypothèse serait que Arc favorise l'activité de PP-1, conduisant à une déphosphorylation accrue des histones H3. Nos données ne permettent pas de conclure précisément sur le mécanisme par lequel Arc régule la phosphorylation des histones mais vont tout de même largement en faveur d'un rôle nucléaire de Arc du fait de la préservation de l'activation et de la translocation nucléaire de ERK.

L'implication de Arc dans des régulations épigénétiques ne se limite pas aux histones H3 puisqu'une étude a récemment montré que Arc module le niveau d'acétylation des histones H4 au niveau de leur Lysine 12 (H4K12) dans des neurones d'hippocampe en culture (Wee et al., 2014). Dans ce modèle, Arc est localisée à proximité des histones H4K12 et sa surexpression tend à augmenter leur acétylation sur ce résidu lysine. Les auteurs proposent que Arc influence ce processus via Tip 60, une histone acétyl-transférase impliquée dans l'acétylation des histones H4, avec laquelle Arc interagit au sein du noyau. Dans les neurones d'hippocampe, Arc interagit également avec une autre enzyme acétyl-transférase, la protéine CBP (Korb et al., 2013). Cette dernière étude n'établit cependant pas de lien entre l'expression de Arc et des modifications post-traductionnelles des histones dépendantes de la CBP. Les auteurs démontrent néanmoins que la surexpression de Arc modifie l'efficacité de la transcription CRE-dépendante dans laquelle CBP joue un rôle majeur (Korb et al., 2013). L'ensemble de ces données démontre le lien étroit qui existe entre l'expression de Arc et les mécanismes de régulation épigénétique de l'expression génique. Si les travaux de Korb et de Wee apportent la preuve d'une interaction directe de Arc avec des enzymes impliquées dans la modification des histones, il reste difficile d'envisager son rôle précis dans la régulation leur activité *in vivo*. Il est important de noter que ces protéines sont impliquées dans d'importants complexes moléculaires formés notamment avec les facteurs de transcription et les protéines de la machinerie transcriptionnelle. Bien que les expériences d'immunoprécipitation (Korb et al., 2013, Wee et al., 2014) apportent des réponses importantes, notamment concernant la présence de Arc dans ces complexes, il est difficile de conclure quant à une interaction spécifique avec CBP ou Tip60.

L'augmentation de la phosphorylation des histones H3 est un processus clé dans le contexte des réponses géniques induites par la cocaïne et présente donc un intérêt majeur dans le cadre de notre étude. Il est cependant envisageable que Arc influence d'autres modifications post-

traductionnelles des histones. L'exposition à la cocaïne affecte de nombreux processus épigénétiques dans les MSN, notamment le niveau d'acétylation de plusieurs résidus lysine des histones H3 et H4 ([Jordi et al., 2013](#)). Dans les MSN, la lysine 5 des histones H4 (H4K5) est particulièrement augmentée en réponse à un traitement aigu ou chronique par la cocaïne. Etant donné l'interaction de Arc avec certaines acétyl-transférases, il est possible d'envisager qu'elle module l'acétylation de certains résidus ciblés par la cocaïne.

b. Arc, chromatine et ARN-Polymérase, vers une régulation de l'activité transcriptionnelle ?

Les modifications post-traductionnelle des histones jouent un rôle central dans la régulation de la structure de la chromatine. Ces modifications changent le niveau d'interaction entre les histones et l'ADN et vont ainsi moduler l'état de compaction de la chromatine. La phosphorylation des histones H3 est notamment associée à une relaxation de l'ADN qui est favorable à l'initiation de la transcription. L'influence de Arc sur ce mécanisme nous a conduit à envisager son implication dans les changements structuraux qui accompagnent la transcription. L'état de compaction de la chromatine est déterminant pour l'initiation de la transcription puisqu'il conditionne l'accessibilité de l'ADN aux protéines impliquées dans ce processus. A l'état basal, la chromatine hautement compactée, ou hétérochromatine, est difficilement accessible à la machinerie transcriptionnelle alors que sa forme relâchée facilite l'accès de ces protéines à l'ADN.

Nos résultats montrent que le traitement par la cocaïne tend à diminuer l'espace occupé par l'hétérochromatine dense au sein du noyau, en accord avec la transcription de nombreux IEG suite à l'injection de cocaïne. Des études ont précédemment montré une diminution de l'hétérochromatine en réponse à un traitement chronique par la cocaïne, suggérant que de tels remodelages pourraient être impliqués dans les effets à long terme de cette drogue ([Maze et al., 2011](#)). Chez les animaux transgéniques, la perte d'expression de Arc conduit également à une diminution de l'hétérochromatine, à l'état basal ainsi qu'après une injection de cocaïne, suggérant que l'absence de Arc est associée à un relâchement de la structure de la chromatine. La diminution de l'espace occupée par l'hétérochromatine de manière constitutive chez les animaux transgéniques traités avec une solution saline démontre que la faible expression basale de Arc dans le noyau observée en absence de cocaïne est suffisante pour promouvoir la compaction de la chromatine. L'effet de la perte d'expression de Arc sur le remodelage de la

chromatine s'accompagne d'une modification de l'activité de la RNA Pol-II. Le changement de l'état de phosphorylation de la RNA Pol-II que nous observons dans notre modèle transgénique suggère que Arc participe à la régulation de la machinerie transcriptionnelle. La partie CTD (**C**-**T**erminal **D**omain) de la RNA Pol-II représente un module central de régulation de la transcription. Cette région est soumise à de nombreuses modifications post-traductionnelles qui jouent un rôle important dans le contrôle de l'initiation et de l'élongation de la transcription (Meinhart et al., 2005). La région CTD correspond à la répétition d'une séquence heptapeptidique contenant 3 sérines dont le niveau de phosphorylation varie au cours des différentes étapes de la transcription selon l'état d'activité de la RNA Pol-II (Buratowski, 2003). La phosphorylation des sérines 2 de ce motif est notamment associée à la phase d'élongation de la transcription. Chez les animaux sauvages, nous observons une augmentation de la phosphorylation de ce résidu en réponse à la cocaïne qui est en accord avec le grand nombre de gènes induits suite à l'injection de cette drogue. L'augmentation de la phosphorylation de ce résidu chez les transgéniques indique que la perte d'expression de Arc est corrélée à une augmentation globale de la phosphorylation de la RNA Pol-II qui est connue pour être associée à une activité transcriptionnelle plus intense (Meinhart et al., 2005). Si ce résultat suggère que l'expression de Arc influence le niveau d'activité de cette protéine, il ne permet cependant pas d'établir un lien précis entre Arc et la RNA Pol-II. Il est également important de noter que l'ensemble de ces données a été obtenu *in vivo* chez des souris transgéniques qui présentent une perte d'expression totale de la protéine. Il n'est donc pas possible de déterminer si les effets observés sont des effets développementaux, cellule-autonome ou encore des effets systémiques résultant de la perte d'expression globale de Arc. Ce problème pourrait être contourné par l'utilisation d'un virus injecté dans le striatum qui permettrait d'inhiber localement l'expression dans cette région avant l'exposition à la cocaïne.

c. Arc, une protéine associée au cytosquelette, vers un rôle structural au sein du noyau ?

Au travers de modèles de perte d'expression et de surexpression de la protéine, nous avons montré qu'il existe un lien étroit entre l'expression de Arc et des processus nucléaires importants pour la régulation de l'expression génique. Nos données sont en accord avec les hypothèses qui émergent actuellement concernant le rôle de cette protéine au sein du noyau. Bien que l'ensemble de ces données converge vers l'implication de Arc dans le remodelage

de la chromatine et les processus transcriptionnels, il apparaît toutefois, à l'heure actuelle, difficile de déterminer le ou les mécanismes moléculaires pouvant rendre compte de son implication dans ces différents mécanismes. Parmi les nombreuses hypothèses envisageables, il en est une qui semble s'accorder avec un bon nombre des données collectées à ce jour. Cette hypothèse repose sur le lien étroit qui existe entre Arc et le cytosquelette et qui pourrait sous-tendre un rôle structurel de Arc au sein du noyau.

Comme son nom l'indique, Activity Regulated and Cytoskeleton-associated protein, l'une des caractéristiques principales de Arc est sa capacité à interagir avec le cytosquelette. Comme nous l'avons vu précédemment, sa séquence présente une forte homologie avec les Spectrine et permet de nombreuses interactions avec des protéines du cytosquelette ou associées au cytosquelette. Depuis l'endocytose des AMPA à la régulation de la dynamique de l'actine, la majorité de ses fonctions décrites à ce jour impliquent une interaction avec des protéines de structure. Il semble donc envisageable que ses fonctions dans le noyau reposent sur des mécanismes similaires.

Le cytosquelette nucléaire, aussi appelé matrice nucléaire, est majoritairement composé d'actine et de myosine qui sont présentes sous forme globulaire et ne forment pas de filaments dans ce compartiment (de Lanerolle and Serebryanny, 2011). Si la présence et les fonctions de l'actine au sein du noyau ont été longtemps débattues, elle est aujourd'hui considérée comme un composant essentiel de l'architecture nucléaire. Parmi ses multiples fonctions, l'actine nucléaire joue notamment un rôle majeur dans la régulation de la transcription (Visa and Percipalle, 2010, de Lanerolle, 2012). Elle est associée aux complexes de remodelage de la chromatine et participe à la dynamique de la chromatine au cours des processus de transcription. Elle se lie également aux trois formes d'ARN polymérases et régule leur interaction avec l'ADN et leur recrutement au cours de la transcription. Si Arc ne se lie pas directement à l'actine, elle est associée à celle-ci par l'intermédiaire de protéines encore inconnues (Lyford et al., 1995). Au vu du lien étroit qu'entretient Arc avec l'actine et de manière plus large avec le cytosquelette, il est possible d'envisager qu'elle soit un de ses partenaires au sein du noyau. En faveur de cette hypothèse, il a été montré que Arc interagit avec une isoforme de β -spectrine, une protéine associée à l'actine nucléaire (Bloomer et al., 2007). Au travers de cette interaction, Arc favorise la formation des PML-Bodies impliqués entre autres dans la régulation de la transcription. Cette interaction directe avec une protéine associée à l'actine est la seule formellement démontrée dans le noyau. Dans le cytoplasme, Arc interagit avec une autre protéine associée à l'actine, la cofiline, cette interaction contribue

à la régulation de la dynamique de l'actine dans les dendrites (Messaoudi et al., 2007). De manière intéressante, la cofiline est également présente dans le noyau où elle est impliquée dans la régulation de l'activité de la RNA Pol-II au cours de la phase d'élongation de la transcription (Obrdlik and Percipalle, 2011). Elle contribue aux changements d'organisation du réseau d'actine permettant la stabilisation de la machinerie transcriptionnelle et le recrutement de ses cofacteurs. L'interaction entre Arc et la cofiline dans le noyau des neurones pourrait être un des mécanismes par lequel Arc influence l'activité de la RNA Pol-II. De ce point de vue, il serait intéressant de caractériser de manière extensive l'ensemble des protéines du cytosquelette nucléaire avec lesquelles Arc est capable d'interagir et d'identifier les régions de sa séquence impliquées dans ces interactions. En inhibant ces interactions, il serait possible d'étudier l'importance de ces interactions pour le recrutement de la machinerie transcriptionnelle et des complexes de remodelage de la chromatine.

De manière plus large, l'interaction de Arc avec la matrice nucléaire pourrait expliquer une partie des données que nous avons obtenues mais également de celles issues de récentes études abordées dans ce chapitre. L'influence de Arc sur différents types de modifications post-traductionnelles des histones pourrait relever d'un rôle structural plus large qui permettrait à la protéine de réguler l'assemblage des complexes de remodelage de la chromatine. Son interaction avec la CBP est également intéressante à la lumière de cette hypothèse puisque CBP interagit directement avec la RNA Pol-II et favorise son recrutement au niveau de l'ADN (Kee et al., 1996). De nombreux arguments indiquent que Arc pourrait être présente à proximité ou au sein des complexes de remodelage de la chromatine et de régulation de la transcription. L'implication de Arc dans le remodelage et l'organisation de la chromatine permettrait également d'expliquer la relaxation de la chromatine qui s'opère en son absence chez les souris transgéniques que nous avons utilisées.

Une étude a récemment montré que Arc est capable de s'oligomériser et que les monomères et les oligomères coexistent dans les neurones (Myrum et al., 2015). Les auteurs proposent que ce mécanisme permette à Arc de jouer un rôle de plateforme pour la formation de complexes protéiques au sein de la cellule. Sous forme d'oligomère, Arc pourrait exercer un rôle de « hub » en contribuant au rapprochement de protéines partenaires et favoriser l'assemblage de complexes fonctionnels dans différents compartiments de la cellule (Myrum et al., 2015). Au sein du noyau, l'interaction de Arc avec des protéines telles que la protéine CBP, pourrait être impliquée dans la formation de complexes de remodelage de la chromatine. De manière très intéressante, l'étude de Myrum et collaborateurs montre que les oligomères ont un taux de

renouvellement beaucoup plus lent que les monomères, laissant envisager des fonctions différentes pour ces deux structures. Les oligomères plus stables pourraient être engagés dans des adaptations cellulaires plus persistantes qui sous-tendent l'établissement de la plasticité neuronale à long terme.

4. Arc répresseur transcriptionnel, vers une régulation homéostatique au sein du noyau

L'ensemble de nos données converge en faveur d'un rôle répresseur de Arc dans la régulation des mécanismes transcriptionnels. L'augmentation de la phosphorylation des histones H3 est importante pour l'induction d'IEG par la cocaïne et notamment *c-fos* (Brami-Cherrier et al., 2005). En réprimant ce phénomène, Arc tend à limiter l'activité transcriptionnelle. De la même manière, les données que j'ai obtenues *in vivo* montrent que l'absence de Arc conduit à une levée de répression sur des processus favorisant l'expression génique, tel que la décompaction de la chromatine et l'activation de la RNA Pol-II. En conséquence de ces observations, l'augmentation d'expression de Arc doit être corrélée à une diminution des réponses transcriptionnelles. Son induction en réponse à la cocaïne tend donc à s'opposer à l'activation transcriptionnelle qui fait suite à l'injection de la drogue. Arc pourrait ainsi agir en limitant l'intensité globale de la transcription et contribuer ainsi à une forme de régulation homéostatique au sein du noyau. Cette hypothèse a progressivement émergé au fil de nos observations et nous apparaissait d'autant plus intéressante qu'elle était en accord avec les régulations homéostatiques exercées par Arc au niveau synaptique via l'endocytose des AMPAR (Shepherd et al., 2006). Au cours de ce travail de thèse, la publication issue du groupe du Pr Finkbeiner (Korb et al., 2013) est venue conforter nos hypothèses en démontrant que Arc exerce un rôle répresseur sur la transcription dépendante des sites CRE. Ces travaux ont montré que Arc régule négativement la transcription des sous-unités GluA1 des AMPAR et contribue ainsi à réduire le niveau d'activité synaptique global du neurone au cours d'une exposition prolongée des neurones à une activité neuronale soutenue. A l'inverse, les travaux de Wee et de ses collaborateurs sont en léger désaccord avec l'hypothèse d'un rôle répresseur de Arc (Wee et al., 2014). Cette étude montre en effet, que Arc favorise l'acétylation de la lysine 12 des histones H4 qui est associée à une augmentation de l'activité transcriptionnelle (Wang et al., 2009).

Nos données, en faveur d'un effet répresseur de Arc sur les réponses transcriptionnelles, sont en accord avec l'étude de Korb et ses collaborateurs. Toutefois, nous ne pouvons pas exclure que Arc puisse exercer des effets différents selon les types de modifications post-traductionnelles. En ligne avec ceci, il est également envisageable que Arc exerce des effets variables sur différents types de promoteurs et contribuerait ainsi à la spécificité du programme transcriptionnel induit par l'activité neuronale. Ces questions pourraient être abordées par la méthode de ChiP (**C**hromatine **i**mmuno**P**réci**P**itation) qui permet d'analyser les protéines liées à une portion d'ADN. Il serait envisageable d'analyser l'expression des différentes modifications post-traductionnelle au niveau de promoteurs de gènes spécifiques chez des animaux transgéniques en comparaison aux animaux sauvages après un traitement par la cocaïne. Cette approche permettrait d'évaluer l'effet de la perte d'expression de Arc sur la mise en place des réponses épigénétiques au niveau de gènes impliqués dans la plasticité neuronale.

L'effet répresseur de Arc sur les différents mécanismes abordés précédemment soulève certaines questions. La transposition *in vivo*, des données obtenues *in vitro* indique que la protéine Arc induite par la cocaïne serait capable d'inhiber la phosphorylation des histones H3, elle-même induite par la cocaïne. Ces deux phénomènes étant augmentés par la cocaïne, l'hypothèse la plus probable serait que Arc limite l'intensité ou la durée de la phosphorylation des histones H3. Si nos données ne permettent pas de répondre formellement à cette question, elles apportent cependant des éléments de réponse. L'analyse des cinétiques d'induction de Arc et de phosphorylation de H3 indique que ces deux phénomènes sont décalés dans le temps suite à l'injection de cocaïne. La phosphorylation des histones H3 est déjà très significativement augmentée dès 10 minutes après l'injection de cocaïne et tend à diminuer à partir de 30 minutes pour revenir à un niveau proche du niveau basal à 60 minutes. En revanche, l'induction de la protéine Arc, n'est significativement augmentée dans le noyau qu'à partir de 30 minutes après l'injection et perdure à un niveau élevée à 60 minutes. En résumé, le pic d'expression de Arc au noyau coïncide avec la diminution du niveau de phosphorylation des histones H3 en accord avec un rôle répresseur de Arc sur la phosphorylation de H3. Arc agirait pour limiter la fenêtre de temps dans laquelle les histones sont phosphorylées. Un effet sur l'intensité de leur phosphorylation est également envisageable.

Nous avons analysé l'effet de la perte d'expression de Arc sur l'intensité et la durée de la phosphorylation des histones H3 chez les souris transgéniques et nos données préliminaires

(nombres d'animaux des trois génotypes encore faible) indiquent que cette phosphorylation est accrues chez les souris transgéniques par rapport aux animaux sauvages 30 minutes après l'injection de cocaïne. D'après ces observations préliminaires ce n'est pas le nombre de cellules positives pour pH3 qui est augmenté mais l'intensité du marquage dans les cellules positives. Le niveau de pH3 étant encore élevé chez les animaux sauvages à 30 minutes, nous souhaitons reproduire cette expérience à un temps plus tardif afin d'examiner l'effet de la perte d'expression de Arc sur la fenêtre temporelle de phosphorylation de H3. Dans l'hypothèse d'un rôle répresseur de Arc, le signal pH3 induit par la cocaïne devrait être allongé en l'absence de Arc. Au regard des données comportementales obtenues par la suite, nous souhaitons également analyser le signal pH3 en réponse à une injection de cocaïne à une dose de 7,5 mg/kg qui permet de mettre en évidence de façon optimale l'effet de l'absence de Arc sur les réponses comportementales induites par la cocaïne. Les animaux transgéniques étant plus sensibles que les sauvages, nous émettons l'hypothèse que les réponses moléculaires à cette faible dose dévoileront des différences entre les différents génotypes qui ne seront plus nettes que celles déjà observées à 15 mg/kg.

Concernant le niveau de phosphorylation de la RNA Pol-II, il est intéressant de noter que des tendances similaires sont obtenues en réponse à la cocaïne chez les animaux sauvages et transgéniques alors que ces deux systèmes sont opposés du point de vue de l'expression de Arc. En effet, les animaux sauvages qui ont un niveau élevé de Arc et les animaux transgéniques qui n'expriment pas la protéine, présentent une augmentation de la phosphorylation de la RNA Pol-II. Comme mentionné précédemment, le modèle utilisé ne permet pas d'exclure que les effets observés soient influencés par des modifications globales du réseau chez ces animaux constitutivement invalidés pour Arc. En parallèle de cette hypothèse, nos observations peuvent également s'expliquer par le fait que la phosphorylation de la polymérase est à un niveau trop élevé chez les sauvages traités à la cocaïne pour pouvoir détecter une augmentation supplémentaire chez les animaux transgéniques. Cette hypothèse est confortée par les résultats obtenus chez les animaux traités à la saline où la différence est clairement visible entre les génotypes. Cette dernière donnée indique également que l'expression basale de Arc dans le noyau est impliquée dans une forme de répression constitutive de la transcription.

5. Arc et les adaptations comportementales induites par la cocaïne

L'expression de Arc est corrélée aux processus neuronaux qui sous-tendent l'apprentissage et la mémoire (Guzowski et al., 1999), et l'invalidation génétique de Arc conduit à d'importants déficits de consolidation de la plasticité synaptique et de la mémoire (Plath et al., 2006). Dans le striatum, nous avons vu précédemment que est Arc induite pendant les phases précoces de l'apprentissage ainsi que les phases d'inversion au cours d'une tâche de « Reversal learning » (Kelly and Deadwyler, 2003, Daberkow et al., 2007). Ceci suggère que Arc pourrait être impliquée dans la plasticité striatale qui sous-tend l'acquisition de nouvelles informations au cours de l'apprentissage. Dans le contexte de l'addiction, Arc est augmentée par l'injection de cocaïne mais également lors de la réexposition à un contexte précédemment associé à la drogue (Hearing et al., 2008). Chez des rats soumis à un protocole d'auto-administration à la cocaïne, l'inhibition locale de Arc dans le striatum dorso-médian n'affecte pas la recherche de la drogue mais bloque l'extinction de ce comportement (Hearing et al., 2011). Ces données suggèrent que l'inhibition de Arc perturbe l'acquisition des nouvelles informations apportées par la phase d'extinction et notamment l'indisponibilité de la drogue. En accord avec l'augmentation de Arc au cours des phases d'inversion de tâche, ces données indiquant que Arc est importante pour la capacité à s'adapter à de nouvelles règles suggérant qu'elle joue un rôle important dans la flexibilité comportementale de manière générale. Nos travaux apportent la première démonstration de l'existence d'un lien causal entre l'expression de Arc et le développement d'adaptations comportementales en réponse à la cocaïne. A des doses élevées de cocaïne, la perte d'expression de Arc est associée à une augmentation de l'activité locomotrice en réponse à la première injection de cocaïne mais également de la sensibilisation locomotrice induite par cette drogue. Les animaux invalidés pour la protéine Arc sont donc plus sensibles à la drogue. Cette sensibilité s'est confirmée avec l'utilisation de doses plus faibles pour lesquelles les animaux transgéniques développent une sensibilisation locomotrice alors que les animaux sauvages n'en développent pas. Etant donné l'importance de l'environnement pour l'expression de Arc, nous étudions actuellement les réponses de ces animaux dans un protocole de préférence de place conditionnée induite par une faible dose de cocaïne. Ceci permettra de mesurer l'impact de la perte d'expression de Arc dans des réponses fortement dépendantes du contexte. Les études menées dans des protocoles d'auto-administration ont précédemment montré que l'inhibition de Arc ne perturbe pas la recherche de la drogue mais altère l'extinction de celle-ci. Ces études menées sur des animaux déjà exposés à la drogue de façon chronique n'avaient pas permis d'établir le rôle de Arc dans le striatum dans le développement des réponses à la cocaïne. A cet égard, notre étude montre pour la première fois que l'expression de Arc exerce un effet répressur sur la mise en place

d'adaptations comportementales durables à la cocaïne. A cet égard, il est important de noter que, dans le contexte de l'auto-administration à la cocaïne, les animaux considérés comme vulnérables présentent un niveau d'expression des ARNm faible alors que les animaux résilients présentent un niveau élevé (Quinn et al., 2015) . La protéine Arc agirait comme un frein sur la mise en place des réponses aux drogues.

L'ensemble de ces données suggère que la protéine Arc pourrait contribuer à la régulation homéostatique dans le cytoplasme et dans le noyau. L'induction de Arc au sein de ces compartiments cellulaires pourrait contribuer à orchestrer différents événements cellulaires critiques pour l'homéostasie neuronale. Arc serait ainsi impliquée dans la régulation de mécanismes cellulaires extrêmement variés depuis la modulation de l'efficacité synaptique jusqu'à son influence sur les complexes de remodelage de la chromatine. L'hypothèse d'un rôle majoritairement structural de Arc permettrait d'expliquer la grande diversité des fonctions cellulaires qu'elle régule. Induite très rapidement par l'activité neuronale et en étroite interaction avec cytosquelette, Arc pourrait assurer un couplage entre les événements synaptiques rapides et transitoires et des changements structuraux importants pour la mise en place de la réponse neuronale.

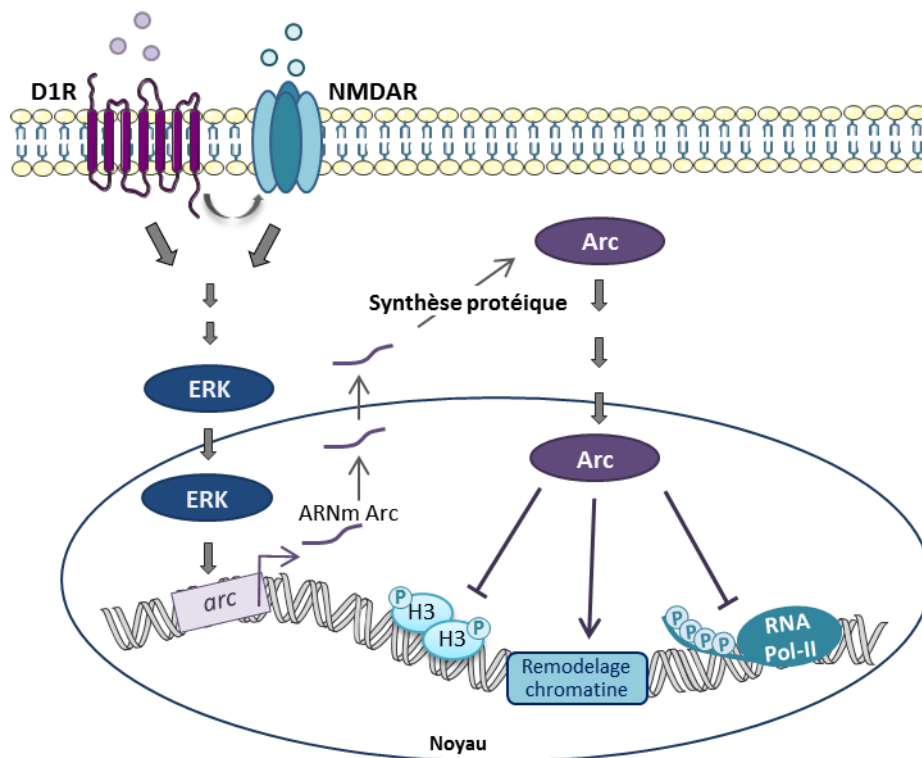


Figure 25 : Schéma bilan récapitulant les travaux obtenus au cours du travail de thèse

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

-A-

- Adams JP, Anderson AE, Varga AW, Dineley KT, Cook RG, Pfaffinger PJ, Sweatt JD (2000) The A-type potassium channel Kv4.2 is a substrate for the mitogen-activated protein kinase ERK. *Journal of neurochemistry* 75:2277-2287.
- Albin RL, Young AB, Penney JB (1989) The functional anatomy of basal ganglia disorders. *Trends Neurosci* 12:366-375.
- Alder J, Thakker-Varia S, Bangasser DA, Kuroiwa M, Plummer MR, Shors TJ, Black IB (2003) Brain-derived neurotrophic factor-induced gene expression reveals novel actions of VGF in hippocampal synaptic plasticity. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 23:10800-10808.
- Alexander GE, Crutcher MD, DeLong MR (1990) Basal ganglia-thalamocortical circuits: parallel substrates for motor, oculomotor, "prefrontal" and "limbic" functions. *Progress in brain research* 85:119-146.
- Allen PB, Zachariou V, Svenningsson P, Lepore AC, Centonze D, Costa C, Rossi S, Bender G, Chen G, Feng J, Snyder GL, Bernardi G, Nestler EJ, Yan Z, Calabresi P, Greengard P (2006) Distinct roles for spinophilin and neurabin in dopamine-mediated plasticity. *Neuroscience* 140:897-911.
- Aosaki T, Graybiel AM, Kimura M (1994) Effect of the nigrostriatal dopamine system on acquired neural responses in the striatum of behaving monkeys. *Science* 265:412-415.
- Arthur JS, Cohen P (2000) MSK1 is required for CREB phosphorylation in response to mitogens in mouse embryonic stem cells. *FEBS letters* 482:44-48.

-B-

- Badiani A, Browman KE, Robinson TE (1995) Influence of novel versus home environments on sensitization to the psychomotor stimulant effects of cocaine and amphetamine. *Brain research* 674:291-298.
- Balleine BW, Delgado MR, Hikosaka O (2007) The role of the dorsal striatum in reward and decision-making. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 27:8161-8165.
- Banko JL, Hou L, Klann E (2004) NMDA receptor activation results in PKA- and ERK-dependent Mnk1 activation and increased eIF4E phosphorylation in hippocampal area CA1. *Journal of neurochemistry* 91:462-470.
- Bannister AJ, Kouzarides T (2011) Regulation of chromatin by histone modifications. *Cell research* 21:381-395.
- Barde YA (1990) The nerve growth factor family. *Progress in growth factor research* 2:237-248.
- Bardo MT, Bevins RA (2000) Conditioned place preference: what does it add to our preclinical understanding of drug reward? *Psychopharmacology* 153:31-43.
- Beauvais G, Jayanthi S, McCoy MT, Ladenheim B, Cadet JL (2010) Differential effects of methamphetamine and SCH23390 on the expression of members of IEG families of transcription factors in the rat striatum. *Brain research* 1318:1-10.
- Beninger RJ, Bellisle F, Milner PM (1977) Schedule control of behavior reinforced by electrical stimulation of the brain. *Science* 196:547-549.
- Berhow MT, Russell DS, Terwilliger RZ, Beitner-Johnson D, Self DW, Lindsay RM, Nestler EJ (1995) Influence of neurotrophic factors on morphine- and cocaine-induced biochemical changes in the mesolimbic dopamine system. *Neuroscience* 68:969-979.

- Berke JD, Hyman SE (2000) Addiction, dopamine, and the molecular mechanisms of memory. *Neuron* 25:515-532.
- Bernardi R, Pandolfi PP (2007) Structure, dynamics and functions of promyelocytic leukaemia nuclear bodies. *Nature reviews Molecular cell biology* 8:1006-1016.
- Berridge KC, Robinson TE (1998) What is the role of dopamine in reward: hedonic impact, reward learning, or incentive salience? *Brain research Brain research reviews* 28:309-369.
- Berridge KC, Robinson TE (2003) Parsing reward. *Trends in Neurosciences* 26:507-513.
- Bertran-Gonzalez J, Bosch C, Maroteaux M, Matamalas M, Herve D, Valjent E, Girault JA (2008) Opposing patterns of signaling activation in dopamine D1 and D2 receptor-expressing striatal neurons in response to cocaine and haloperidol. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 28:5671-5685.
- Besnard A, Bouveyron N, Kappes V, Pascoli V, Pages C, Heck N, Vanhoutte P, Caboche J (2011) Alterations of molecular and behavioral responses to cocaine by selective inhibition of Elk-1 phosphorylation. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 31:14296-14307.
- Bhakar AL, Dolen G, Bear MF (2012) The pathophysiology of fragile X (and what it teaches us about synapses). *Annual review of neuroscience* 35:417-443.
- Bibb JA, Chen J, Taylor JR, Svenningsson P, Nishi A, Snyder GL, Yan Z, Sagawa ZK, Ouimet CC, Nairn AC, Nestler EJ, Greengard P (2001) Effects of chronic exposure to cocaine are regulated by the neuronal protein Cdk5. *Nature* 410:376-380.
- Bloomer WA, VanDongen HM, VanDongen AM (2007) Activity-regulated cytoskeleton-associated protein Arc/Arg3.1 binds to spectrin and associates with nuclear promyelocytic leukemia (PML) bodies. *Brain research* 1153:20-33.
- Boudreau AC, Reimers JM, Milovanovic M, Wolf ME (2007) Cell surface AMPA receptors in the rat nucleus accumbens increase during cocaine withdrawal but internalize after cocaine challenge in association with altered activation of mitogen-activated protein kinases. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 27:10621-10635.
- Bozarth MA, Wise RA (1985) Toxicity associated with long-term intravenous heroin and cocaine self-administration in the rat. *Jama* 254:81-83.
- Bracci E, Centonze D, Bernardi G, Calabresi P (2002) Dopamine excites fast-spiking interneurons in the striatum. *Journal of neurophysiology* 87:2190-2194.
- Brakeman PR, Lanahan AA, O'Brien R, Roche K, Barnes CA, Huganir RL, Worley PF (1997) Homer: a protein that selectively binds metabotropic glutamate receptors. *Nature* 386:284-288.
- Bramham CR (2008) Local protein synthesis, actin dynamics, and LTP consolidation. *Current opinion in neurobiology* 18:524-531.
- Bramham CR, Alme MN, Bittins M, Kuipers SD, Nair RR, Pai B, Panja D, Schubert M, Soule J, Tiron A, Wibrand K (2010) The Arc of synaptic memory. *Experimental brain research* 200:125-140.
- Bramham CR, Wells DG (2007) Dendritic mRNA: transport, translation and function. *Nature reviews Neuroscience* 8:776-789.
- Brami-Cherrier K, Roze E, Girault JA, Betuing S, Caboche J (2009) Role of the ERK/MSK1 signalling pathway in chromatin remodelling and brain responses to drugs of abuse. *Journal of neurochemistry* 108:1323-1335.
- Brami-Cherrier K, Valjent E, Herve D, Darragh J, Corvol JC, Pages C, Arthur SJ, Girault JA, Caboche J (2005) Parsing molecular and behavioral effects of cocaine in mitogen- and stress-activated protein kinase-1-deficient mice. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 25:11444-11454.
- Bredt DS, Nicoll RA (2003) AMPA receptor trafficking at excitatory synapses. *Neuron* 40:361-379.
- Browman KE, Badiani A, Robinson TE (1998) The influence of environment on the induction of sensitization to the psychomotor activating effects of intravenous cocaine in rats is dose-dependent. *Psychopharmacology (Berl)* 137:90-98.
- Buchwalter G, Gross C, Wasylyk B (2004) Ets ternary complex transcription factors. *Gene* 324:1-14.
- Buratowski S (2003) The CTD code. *Nature structural biology* 10:679-680.

Buxbaum AR, Haimovich G, Singer RH (2015) In the right place at the right time: visualizing and understanding mRNA localization. *Nature reviews Molecular cell biology* 16:95-109.

-C-

- Cahill E, Pascoli V, Trifilieff P, Savoldi D, Kappes V, Luscher C, Caboche J, Vanhoutte P (2014a) D1R/GluN1 complexes in the striatum integrate dopamine and glutamate signalling to control synaptic plasticity and cocaine-induced responses. *Molecular psychiatry* 19:1295-1304.
- Cahill E, Salery M, Vanhoutte P, Caboche J (2014b) Convergence of dopamine and glutamate signaling onto striatal ERK activation in response to drugs of abuse. *Frontiers in pharmacology* 4:172.
- Cannon CM, Palmiter RD (2003) Reward without dopamine. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 23:10827-10831.
- Cao VY, Ye Y, Mastwal S, Ren M, Coon M, Liu Q, Costa RM, Wang KH (2015) Motor Learning Consolidates Arc-Expressing Neuronal Ensembles in Secondary Motor Cortex. *Neuron* 86:1385-1392.
- Cardinal RN, Everitt BJ (2004) Neural and psychological mechanisms underlying appetitive learning: links to drug addiction. *Current opinion in neurobiology* 14:156-162.
- Carlezon WA, Jr., Duman RS, Nestler EJ (2005) The many faces of CREB. *Trends Neurosci* 28:436-445.
- Cazorla M, de Carvalho FD, Chohan MO, Shegda M, Chuhma N, Rayport S, Ahmari SE, Moore H, Kellendonk C (2014) Dopamine D2 receptors regulate the anatomical and functional balance of basal ganglia circuitry. *Neuron* 81:153-164.
- Centonze D, Bracci E, Pisani A, Gubellini P, Bernardi G, Calabresi P (2002) Activation of dopamine D1-like receptors excites LTS interneurons of the striatum. *The European journal of neuroscience* 15:2049-2052.
- Centonze D, Grande C, Usiello A, Gubellini P, Erbs E, Martin AB, Pisani A, Tognazzi N, Bernardi G, Moratalla R, Borrelli E, Calabresi P (2003) Receptor subtypes involved in the presynaptic and postsynaptic actions of dopamine on striatal interneurons. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 23:6245-6254.
- Chang YF, Imam JS, Wilkinson MF (2007) The nonsense-mediated decay RNA surveillance pathway. *Annual review of biochemistry* 76:51-74.
- Chen J, Zhang Y, Kelz MB, Steffen C, Ang ES, Zeng L, Nestler EJ (2000) Induction of cyclin-dependent kinase 5 in the hippocampus by chronic electroconvulsive seizures: role of [Delta]FosB. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 20:8965-8971.
- Chen R, Tilley MR, Wei H, Zhou F, Zhou FM, Ching S, Quan N, Stephens RL, Hill ER, Nottoli T, Han DD, Gu HH (2006) Abolished cocaine reward in mice with a cocaine-insensitive dopamine transporter. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103:9333-9338.
- Choe Y, Lee BJ, Kim K (2002) Participation of protein kinase C alpha isoform and extracellular signal-regulated kinase in neurite outgrowth of GT1 hypothalamic neurons. *Journal of neurochemistry* 83:1412-1422.
- Chotiner JK, Nielson J, Farris S, Lewandowski G, Huang F, Banos K, de Leon R, Steward O (2010) Assessment of the role of MAP kinase in mediating activity-dependent transcriptional activation of the immediate early gene Arc/Arg3.1 in the dentate gyrus in vivo. *Learning & memory* 17:117-129.
- Chowdhury S, Shepherd JD, Okuno H, Lyford G, Petralia RS, Plath N, Kuhl D, Huganir RL, Worley PF (2006) Arc/Arg3.1 interacts with the endocytic machinery to regulate AMPA receptor trafficking. *Neuron* 52:445-459.
- Collins RJ, Weeks JR, Cooper MM, Good PI, Russell RR (1984a) Prediction of abuse liability of drugs using IV self-administration by rats. *Psychopharmacology (Berl)* 82:6-13.

- Collins WE, Campbell CC, Barber A, Skinner JC, Huong AY (1984b) The effect of oral contraceptives in malaria infections in rhesus monkey. *Bulletin of the World Health Organization* 62:627-637.
- Conner SD, Schmid SL (2003) Regulated portals of entry into the cell. *Nature* 422:37-44.
- Corbett D, Wise RA (1980) Intracranial self-stimulation in relation to the ascending dopaminergic systems of the midbrain: a moveable electrode mapping study. *Brain research* 185:1-15.
- Correa SA, Hunter CJ, Palygin O, Wauters SC, Martin KJ, McKenzie C, McKelvey K, Morris RG, Pankratov Y, Arthur JS, Frenguelli BG (2012) MSK1 regulates homeostatic and experience-dependent synaptic plasticity. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 32:13039-13051.
- Costa-Mattioli M, Sonenberg N, Richter JD (2009) Translational regulatory mechanisms in synaptic plasticity and memory storage. *Progress in molecular biology and translational science* 90:293-311.
- Craig TJ, Jaafari N, Petrovic MM, Jacobs SC, Rubin PP, Mellor JR, Henley JM (2012) Homeostatic synaptic scaling is regulated by protein SUMOylation. *The Journal of biological chemistry* 287:22781-22788.
- Crosio C, Cermakian N, Allis CD, Sassone-Corsi P (2000) Light induces chromatin modification in cells of the mammalian circadian clock. *Nature neuroscience* 3:1241-1247.
- Cui G, Jun SB, Jin X, Pham MD, Vogel SS, Lovinger DM, Costa RM (2013) Concurrent activation of striatal direct and indirect pathways during action initiation. *Nature* 494:238-242.
- Daberkow DP, Riedy MD, Kesner RP, Keefe KA (2007) Arc mRNA induction in striatal efferent neurons associated with response learning. *The European journal of neuroscience* 26:228-241.

-D-

- Darnell JC, Van Driesche SJ, Zhang C, Hung KY, Mele A, Fraser CE, Stone EF, Chen C, Fak JJ, Chi SW, Licatalosi DD, Richter JD, Darnell RB (2011) FMRP stalls ribosomal translocation on mRNAs linked to synaptic function and autism. *Cell* 146:247-261.
- de Lanerolle P (2012) Nuclear actin and myosins at a glance. *Journal of cell science* 125:4945-4949.
- de Lanerolle P, Serebryanny L (2011) Nuclear actin and myosins: life without filaments. *Nature cell biology* 13:1282-1288.
- Deak M, Clifton AD, Lucocq LM, Alessi DR (1998) Mitogen- and stress-activated protein kinase-1 (MSK1) is directly activated by MAPK and SAPK2/p38, and may mediate activation of CREB. *The EMBO journal* 17:4426-4441.
- Derkinderen P, Enslen H, Girault JA (1999) The ERK/MAP-kinases cascade in the nervous system. *Neuroreport* 10:R24-34.
- Deroche-Gamonet V, Belin D, Piazza PV (2004) Evidence for addiction-like behavior in the rat. *Science* 305:1014-1017.
- Di Chiara G (1998) A motivational learning hypothesis of the role of mesolimbic dopamine in compulsive drug use. *Journal of psychopharmacology* 12:54-67.
- Di Chiara G, Imperato A (1988) Drugs abused by humans preferentially increase synaptic dopamine concentrations in the mesolimbic system of freely moving rats. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 85:5274-5278.
- Dictenberg JB, Swanger SA, Antar LN, Singer RH, Bassell GJ (2008) A direct role for FMRP in activity-dependent dendritic mRNA transport links filopodial-spine morphogenesis to fragile X syndrome. *Developmental cell* 14:926-939.
- Dillon C, Goda Y (2005) The actin cytoskeleton: integrating form and function at the synapse. *Annual review of neuroscience* 28:25-55.
- Djinovic-Carugo K, Gautel M, Ylanne J, Young P (2002) The spectrin repeat: a structural platform for cytoskeletal protein assemblies. *FEBS letters* 513:119-123.

- Donai H, Sugiura H, Ara D, Yoshimura Y, Yamagata K, Yamauchi T (2003) Interaction of Arc with CaM kinase II and stimulation of neurite extension by Arc in neuroblastoma cells expressing CaM kinase II. *Neuroscience Research* 47:399-408.
- Dong E, Caruncho H, Liu WS, Smalheiser NR, Grayson DR, Costa E, Guidotti A (2003) A reelin-integrin receptor interaction regulates Arc mRNA translation in synaptoneurosomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100:5479-5484.
- Dynes JL, Steward O (2007) Dynamics of bidirectional transport of Arc mRNA in neuronal dendrites. *The Journal of comparative neurology* 500:433-447.

-E-

- Eguchi M, Yamaguchi S (2009) In vivo and in vitro visualization of gene expression dynamics over extensive areas of the brain. *NeuroImage* 44:1274-1283.
- Everitt BJ, Cardinal RN, Parkinson JA, Robbins TW (2003) Appetitive behavior: impact of amygdala-dependent mechanisms of emotional learning. *Annals of the New York Academy of Sciences* 985:233-250.
- Everitt BJ, Wolf ME (2002) Psychomotor stimulant addiction: a neural systems perspective. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 22:3312-3320.

-F-

- Farnsworth CL, Freshney NW, Rosen LB, Ghosh A, Greenberg ME, Feig LA (1995) Calcium activation of Ras mediated by neuronal exchange factor Ras-GRF. *Nature* 376:524-527.
- Fasano S, D'Antoni A, Orban PC, Valjent E, Putignano E, Vara H, Pizzorusso T, Giustetto M, Yoon B, Soloway P, Maldonado R, Caboche J, Brambilla R (2009) Ras-guanine nucleotide-releasing factor 1 (Ras-GRF1) controls activation of extracellular signal-regulated kinase (ERK) signaling in the striatum and long-term behavioral responses to cocaine. *Biological psychiatry* 66:758-768.
- Ferguson SM, Fasano S, Yang P, Brambilla R, Robinson TE (2006) Knockout of ERK1 enhances cocaine-evoked immediate early gene expression and behavioral plasticity. *Neuropsychopharmacology : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology* 31:2660-2668.
- Ferguson SM, Robinson TE (2004) Amphetamine-evoked gene expression in striatopallidal neurons: regulation by corticostriatal afferents and the ERK/MAPK signaling cascade. *Journal of neurochemistry* 91:337-348.
- Finkbeiner S, Greenberg ME (1996) Ca(2+)-dependent routes to Ras: mechanisms for neuronal survival, differentiation, and plasticity? *Neuron* 16:233-236.
- Fiore RS, Bayer VE, Pelech SL, Posada J, Cooper JA, Baraban JM (1993) p42 mitogen-activated protein kinase in brain: prominent localization in neuronal cell bodies and dendrites. *Neuroscience* 55:463-472.
- Flavell SW, Cowan CW, Kim TK, Greer PL, Lin Y, Paradis S, Griffith EC, Hu LS, Chen C, Greenberg ME (2006) Activity-dependent regulation of MEF2 transcription factors suppresses excitatory synapse number. *Science* 311:1008-1012.
- Flavell SW, Greenberg ME (2008) Signaling mechanisms linking neuronal activity to gene expression and plasticity of the nervous system. *Annual review of neuroscience* 31:563-590.
- Fosnaugh JS, Bhat RV, Yamagata K, Worley PF, Baraban JM (1995) Activation of arc, a putative "effector" immediate early gene, by cocaine in rat brain. *Journal of neurochemistry* 64:2377-2380.

- Freeman WM, Brebner K, Lynch WJ, Patel KM, Robertson DJ, Roberts DC, Vrana KE (2002) Changes in rat frontal cortex gene expression following chronic cocaine. *Brain research Molecular brain research* 104:11-20.
- Frodin M, Jensen CJ, Merienne K, Gammeltoft S (2000) A phosphoserine-regulated docking site in the protein kinase RSK2 that recruits and activates PDK1. *The EMBO journal* 19:2924-2934.
- Fujiyama K, Kajii Y, Hiraoka S, Nishikawa T (2003) Differential regulation by stimulants of neocortical expression of *mrt1*, *arc*, and *homer1a* mRNA in the rats treated with repeated methamphetamine. *Synapse* 49:143-149.
- Fukazawa Y, Saitoh Y, Ozawa F, Ohta Y, Mizuno K, Inokuchi K (2003) Hippocampal LTP is accompanied by enhanced F-actin content within the dendritic spine that is essential for late LTP maintenance in vivo. *Neuron* 38:447-460.
- Fukuda M, Gotoh I, Adachi M, Gotoh Y, Nishida E (1997) A novel regulatory mechanism in the mitogen-activated protein (MAP) kinase cascade. Role of nuclear export signal of MAP kinase kinase. *The Journal of biological chemistry* 272:32642-32648.
- Fumagalli F, Bedogni F, Frasca A, Di Pasquale L, Racagni G, Riva MA (2006) Corticostriatal up-regulation of activity-regulated cytoskeletal-associated protein expression after repeated exposure to cocaine. *Molecular pharmacology* 70:1726-1734.
- Fumagalli F, Frasca A, Racagni G, Riva MA (2009) Antipsychotic drugs modulate Arc expression in the rat brain. *European neuropsychopharmacology : the journal of the European College of Neuropsychopharmacology* 19:109-115.
- Futter M, Uematsu K, Bullock SA, Kim Y, Hemmings HC, Jr., Nishi A, Greengard P, Nairn AC (2005) Phosphorylation of spinophilin by ERK and cyclin-dependent PK 5 (Cdk5). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102:3489-3494.



- Gao M, Sossa K, Song L, Errington L, Cummings L, Hwang H, Kuhl D, Worley P, Lee HK (2010) A specific requirement of Arc/Arg3.1 for visual experience-induced homeostatic synaptic plasticity in mouse primary visual cortex. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 30:7168-7178.
- Gao Y, Tatavarty V, Korza G, Levin MK, Carson JH (2008) Multiplexed dendritic targeting of alpha calcium calmodulin-dependent protein kinase II, neurogranin, and activity-regulated cytoskeleton-associated protein RNAs by the A2 pathway. *Molecular biology of the cell* 19:2311-2327.
- Gerdjikov TV, Ross GM, Beninger RJ (2004) Place preference induced by nucleus accumbens amphetamine is impaired by antagonists of ERK or p38 MAP kinases in rats. *Behavioral neuroscience* 118:740-750.
- Gerfen CR (2006) Indirect-pathway neurons lose their spines in Parkinson disease. *Nature neuroscience* 9:157-158.
- Gerfen CR, Engber TM, Mahan LC, Susel Z, Chase TN, Monsma FJ, Jr., Sibley DR (1990) D1 and D2 dopamine receptor-regulated gene expression of striatonigral and striatopallidal neurons. *Science* 250:1429-1432.
- Gerfen CR, Paletzki R, Worley P (2008) Differences between dorsal and ventral striatum in *Drd1a* dopamine receptor coupling of dopamine- and cAMP-regulated phosphoprotein-32 to activation of extracellular signal-regulated kinase. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 28:7113-7120.
- Gerfen CR, Young WS, 3rd (1988) Distribution of striatonigral and striatopallidal peptidergic neurons in both patch and matrix compartments: an in situ hybridization histochemistry and fluorescent retrograde tracing study. *Brain research* 460:161-167.

- Gille H, Kortenjann M, Thomae O, Moomaw C, Slaughter C, Cobb MH, Shaw PE (1995) ERK phosphorylation potentiates Elk-1-mediated ternary complex formation and transactivation. *The EMBO journal* 14:951-962.
- Gingras AC, Raught B, Sonenberg N (1999) eIF4 initiation factors: effectors of mRNA recruitment to ribosomes and regulators of translation. *Annual review of biochemistry* 68:913-963.
- Giorgi C, Yeo GW, Stone ME, Katz DB, Burge C, Turrigiano G, Moore MJ (2007) The EJC factor eIF4AIII modulates synaptic strength and neuronal protein expression. *Cell* 130:179-191.
- Girault JA, Valjent E, Caboche J, Herve D (2007) ERK2: a logical AND gate critical for drug-induced plasticity? *Current opinion in pharmacology* 7:77-85.
- Goto A, Nakahara I, Yamaguchi T, Kamioka Y, Sumiyama K, Matsuda M, Nakanishi S, Funabiki K (2015) Circuit-dependent striatal PKA and ERK signaling underlies rapid behavioral shift in mating reaction of male mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 112:6718-6723.
- Gouty-Colomer LA, Hosseini B, Marcelo IM, Schreiber J, Slump DE, Yamaguchi S, Houweling AR, Jaarsma D, Elgersma Y, Kushner SA (2015) Arc expression identifies the lateral amygdala fear memory trace. *Molecular psychiatry*.
- Graveland GA, DiFiglia M (1985) The frequency and distribution of medium-sized neurons with indented nuclei in the primate and rodent neostriatum. *Brain research* 327:307-311.
- Graybiel AM (1990) The basal ganglia and the initiation of movement. *Revue neurologique* 146:570-574.
- Graybiel AM, Moratalla R, Robertson HA (1990) Amphetamine and cocaine induce drug-specific activation of the c-fos gene in striosome-matrix compartments and limbic subdivisions of the striatum. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 87:6912-6916.
- Greengard P, Allen PB, Nairn AC (1999) Beyond the dopamine receptor: the DARPP-32/protein phosphatase-1 cascade. *Neuron* 23:435-447.
- Greer PL, Hanayama R, Bloodgood BL, Mardinly AR, Lipton DM, Flavell SW, Kim TK, Griffith EC, Waldon Z, Maehr R, Ploegh HL, Chowdhury S, Worley PF, Steen J, Greenberg ME (2010) The Angelman Syndrome protein Ube3A regulates synapse development by ubiquitinating arc. *Cell* 140:704-716.
- Grewal SS, York RD, Stork PJ (1999) Extracellular-signal-regulated kinase signalling in neurons. *Current opinion in neurobiology* 9:544-553.
- Grimm JW, Hope BT, Wise RA, Shaham Y (2001) Neuroadaptation. Incubation of cocaine craving after withdrawal. *Nature* 412:141-142.
- Grimm JW, Lu L, Hayashi T, Hope BT, Su TP, Shaham Y (2003) Time-dependent increases in brain-derived neurotrophic factor protein levels within the mesolimbic dopamine system after withdrawal from cocaine: implications for incubation of cocaine craving. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 23:742-747.
- Guzowski JF (2002) Insights into immediate-early gene function in hippocampal memory consolidation using antisense oligonucleotide and fluorescent imaging approaches. *Hippocampus* 12:86-104.
- Guzowski JF, Knierim JJ, Moser EI (2004) Ensemble dynamics of hippocampal regions CA3 and CA1. *Neuron* 44:581-584.
- Guzowski JF, Lyford GL, Stevenson GD, Houston FP, McGaugh JL, Worley PF, Barnes CA (2000) Inhibition of activity-dependent arc protein expression in the rat hippocampus impairs the maintenance of long-term potentiation and the consolidation of long-term memory. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 20:3993-4001.
- Guzowski JF, McNaughton BL, Barnes CA, Worley PF (1999) Environment-specific expression of the immediate-early gene Arc in hippocampal neuronal ensembles. *Nature neuroscience* 2:1120-1124.
- Guzowski JF, Setlow B, Wagner EK, McGaugh JL (2001) Experience-dependent gene expression in the rat hippocampus after spatial learning: a comparison of the immediate-early genes Arc, c-fos,

and zif268. The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience 21:5089-5098.

Guzowski JF, Timlin JA, Roysam B, McNaughton BL, Worley PF, Barnes CA (2005) Mapping behaviorally relevant neural circuits with immediate-early gene expression. Current opinion in neurobiology 15:599-606.

-H-

Haber SN (2003) The primate basal ganglia: parallel and integrative networks. Journal of Chemical Neuroanatomy 26:317-330.

Hearing MC, Schochet TL, See RE, McGinty JF (2010) Context-driven cocaine-seeking in abstinent rats increases activity-regulated gene expression in the basolateral amygdala and dorsal hippocampus differentially following short and long periods of abstinence. Neuroscience 170:570-579.

Hearing MC, Schwendt M, McGinty JF (2011) Suppression of activity-regulated cytoskeleton-associated gene expression in the dorsal striatum attenuates extinction of cocaine-seeking. The international journal of neuropsychopharmacology / official scientific journal of the Collegium Internationale Neuropsychopharmacologicum 14:784-795.

Hearing MC, See RE, McGinty JF (2008) Relapse to cocaine-seeking increases activity-regulated gene expression differentially in the striatum and cerebral cortex of rats following short or long periods of abstinence. Brain structure & function 213:215-227.

Heck N, Betuing S, Vanhoutte P, Caboche J (2012) A deconvolution method to improve automated 3D-analysis of dendritic spines: application to a mouse model of Huntington's disease. Brain structure & function 217:421-434.

Heck N, Dos Santos M, Amairi B, Salery M, Besnard A, Herzog E, Boudier T, Vanhoutte P, Caboche J (2014) A new automated 3D detection of synaptic contacts reveals the formation of cortico-striatal synapses upon cocaine treatment in vivo. Brain structure & function.

Heffron DS, Mandell JW (2005) Opposing roles of ERK and p38 MAP kinases in FGF2-induced astroglial process extension. Molecular and cellular neurosciences 28:779-790.

Herve D, Le Moine C, Corvol JC, Belluscio L, Ledent C, Fienberg AA, Jaber M, Studler JM, Girault JA (2001) Galpha(olf) levels are regulated by receptor usage and control dopamine and adenosine action in the striatum. The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience 21:4390-4399.

Hicks A, Davis S, Rodger J, Helme-Guizon A, Laroche S, Mallet J (1997) Synapsin I and syntaxin 1B: key elements in the control of neurotransmitter release are regulated by neuronal activation and long-term potentiation in vivo. Neuroscience 79:329-340.

Hinshaw JE (2000) Dynamin and its role in membrane fission. Annual review of cell and developmental biology 16:483-519.

Hipskind RA, Rao VN, Mueller CG, Reddy ES, Nordheim A (1991) Ets-related protein Elk-1 is homologous to the c-fos regulatory factor p62TCF. Nature 354:531-534.

Hollister RD, Page KJ, Hyman BT (1997) Distribution of the messenger RNA for the extracellularly regulated kinases 1, 2 and 3 in rat brain: effects of excitotoxic hippocampal lesions. Neuroscience 79:1111-1119.

Huang F, Chotiner JK, Steward O (2007) Actin polymerization and ERK phosphorylation are required for Arc/Arg3.1 mRNA targeting to activated synaptic sites on dendrites. The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience 27:9054-9067.

Hyman BT, Reiter J, Moss M, Rosene D, Pandya D (1994) Extracellular signal-regulated kinase (MAP kinase) immunoreactivity in the rhesus monkey brain. Neuroscience letters 166:113-116.

Hyman SE, Malenka RC, Nestler EJ (2006) Neural mechanisms of addiction: the role of reward-related learning and memory. Annual review of neuroscience 29:565-598.

-I-

- Ibba F, Vinci S, Spiga S, Peana AT, Assaretti AR, Spina L, Longoni R, Acquas E (2009) Ethanol-induced extracellular signal regulated kinase: role of dopamine D1 receptors. *Alcoholism, clinical and experimental research* 33:858-867.
- Irie Y, Yamagata K, Gan Y, Miyamoto K, Do E, Kuo CH, Taira E, Miki N (2000) Molecular Cloning and Characterization of Amida, a Novel Protein Which Interacts with a Neuron-specific Immediate Early Gene Product Arc, Contains Novel Nuclear Localization Signals, and Causes Cell Death in Cultured Cells. *Journal of Biological Chemistry* 275:2647-2653.
- Ito H, Morishita R, Shinoda T, Iwamoto I, Sudo K, Okamoto K, Nagata K (2010) Dysbindin-1, WAVE2 and Abi-1 form a complex that regulates dendritic spine formation. *Molecular psychiatry* 15:976-986.

-J-

- Janknecht R, Ernst WH, Pingoud V, Nordheim A (1993) Activation of ternary complex factor Elk-1 by MAP kinases. *The EMBO journal* 12:5097-5104.
- Jenab S, Festa ED, Nazarian A, Wu HB, Sun WL, Hazim R, Russo SJ, Quinones-Jenab V (2005) Cocaine induction of ERK proteins in dorsal striatum of Fischer rats. *Brain research Molecular brain research* 142:134-138.
- Jordi E, Heiman M, Marion-Poll L, Guermonprez P, Cheng SK, Nairn AC, Greengard P, Girault JA (2013) Differential effects of cocaine on histone posttranslational modifications in identified populations of striatal neurons. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110:9511-9516.
- Jovanovic JN, Benfenati F, Siow YL, Sihra TS, Sanghera JS, Pelech SL, Greengard P, Czernik AJ (1996) Neurotrophins stimulate phosphorylation of synapsin I by MAP kinase and regulate synapsin I-actin interactions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93:3679-3683.
- Jovanovic JN, Czernik AJ, Fienberg AA, Greengard P, Sihra TS (2000) Synapsins as mediators of BDNF-enhanced neurotransmitter release. *Nature neuroscience* 3:323-329.

-K-

- Kalivas PW (2004) Glutamate systems in cocaine addiction. *Current opinion in pharmacology* 4:23-29.
- Kalivas PW, Duffy P (1995) D1 receptors modulate glutamate transmission in the ventral tegmental area. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 15:5379-5388.
- Kalivas PW, Nakamura M (1999) Neural systems for behavioral activation and reward. *Current opinion in neurobiology* 9:223-227.
- Kalivas PW, Peters J, Knackstedt L (2006) Animal models and brain circuits in drug addiction. *Molecular interventions* 6:339-344.
- Kalivas PW, Volkow N, Seamans J (2005) Unmanageable motivation in addiction: a pathology in prefrontal-accumbens glutamate transmission. *Neuron* 45:647-650.
- Kalivas PW, Volkow ND (2005) The neural basis of addiction: a pathology of motivation and choice. *The American journal of psychiatry* 162:1403-1413.
- Kanai Y, Dohmae N, Hirokawa N (2004) Kinesin transports RNA: isolation and characterization of an RNA-transporting granule. *Neuron* 43:513-525.
- Kandel ER (2001) The molecular biology of memory storage: a dialogue between genes and synapses. *Science* 294:1030-1038.

- Kawaguchi Y, Wilson CJ, Augood SJ, Emson PC (1995) Striatal interneurons: chemical, physiological and morphological characterization. *Trends Neurosci* 18:527-535.
- Kawashima T, Okuno H, Nonaka M, Adachi-Morishima A, Kyo N, Okamura M, Takemoto-Kimura S, Worley PF, Bito H (2009) Synaptic activity-responsive element in the Arc/Arg3.1 promoter essential for synapse-to-nucleus signaling in activated neurons. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106:316-321.
- Kee BL, Arias J, Montminy MR (1996) Adaptor-mediated recruitment of RNA polymerase II to a signal-dependent activator. *The Journal of biological chemistry* 271:2373-2375.
- Kelleher RJ, 3rd, Govindarajan A, Jung HY, Kang H, Tonegawa S (2004a) Translational control by MAPK signaling in long-term synaptic plasticity and memory. *Cell* 116:467-479.
- Kelleher RJ, 3rd, Govindarajan A, Tonegawa S (2004b) Translational regulatory mechanisms in persistent forms of synaptic plasticity. *Neuron* 44:59-73.
- Kelley AE (2004) Memory and addiction: shared neural circuitry and molecular mechanisms. *Neuron* 44:161-179.
- Kelly MP, Deadwyler SA (2002) Acquisition of a novel behavior induces higher levels of Arc mRNA than does overtrained performance. *Neuroscience* 110:617-626.
- Kelly MP, Deadwyler SA (2003) Experience-dependent regulation of the immediate-early gene arc differs across brain regions. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 23:6443-6451.
- Kimura M (1995) Role of basal ganglia in behavioral learning. *Neurosci Res* 22:353-358.
- Kita H, Kitai ST (1990) Amygdaloid projections to the frontal cortex and the striatum in the rat. *The Journal of comparative neurology* 298:40-49.
- Klebaur JE, Ostrander MM, Norton CS, Watson SJ, Akil H, Robinson TE (2002) The ability of amphetamine to evoke arc (Arg 3.1) mRNA expression in the caudate, nucleus accumbens and neocortex is modulated by environmental context. *Brain research* 930:30-36.
- Knauf U, Tschopp C, Gram H (2001) Negative regulation of protein translation by mitogen-activated protein kinase-interacting kinases 1 and 2. *Molecular and cellular biology* 21:5500-5511.
- Kobayashi H, Yamamoto S, Maruo T, Murakami F (2005) Identification of a cis-acting element required for dendritic targeting of activity-regulated cytoskeleton-associated protein mRNA. *The European journal of neuroscience* 22:2977-2984.
- Kodama M, Akiyama K, Ujike H, Shimizu Y, Tanaka Y, Kuroda S (1998) A robust increase in expression of arc gene, an effector immediate early gene, in the rat brain after acute and chronic methamphetamine administration. *Brain research* 796:273-283.
- Konradi C, Leveque JC, Hyman SE (1996) Amphetamine and dopamine-induced immediate early gene expression in striatal neurons depends on postsynaptic NMDA receptors and calcium. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 16:4231-4239.
- Koob GF (2006) The neurobiology of addiction: a neuroadaptational view relevant for diagnosis. *Addiction* 101 Suppl 1:23-30.
- Koob GF, Le Moal M (1997) Drug abuse: hedonic homeostatic dysregulation. *Science* 278:52-58.
- Korb E, Finkbeiner S (2011) Arc in synaptic plasticity: from gene to behavior. *Trends Neurosci* 34:591-598.
- Korb E, Wilkinson CL, Delgado RN, Lovero KL, Finkbeiner S (2013) Arc in the nucleus regulates PML-dependent GluA1 transcription and homeostatic plasticity. *Nature neuroscience* 16:874-883.
- Koya E, Uejima JL, Wihbey KA, Bossert JM, Hope BT, Shaham Y (2009) Role of ventral medial prefrontal cortex in incubation of cocaine craving. *Neuropharmacology* 56 Suppl 1:177-185.
- Kravitz AV, Freeze BS, Parker PR, Kay K, Thwin MT, Deisseroth K, Kreitzer AC (2010) Regulation of parkinsonian motor behaviours by optogenetic control of basal ganglia circuitry. *Nature* 466:622-626.
- Kreitzer AC, Malenka RC (2008) Striatal plasticity and basal ganglia circuit function. *Neuron* 60:543-554.

- Kuhnle S, Mothes B, Matentzoglou K, Scheffner M (2013) Role of the ubiquitin ligase E6AP/UBE3A in controlling levels of the synaptic protein Arc. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110:8888-8893.
- Kumar A, Choi KH, Renthal W, Tsankova NM, Theobald DE, Truong HT, Russo SJ, Laplant Q, Sasaki TS, Whistler KN, Neve RL, Self DW, Nestler EJ (2005) Chromatin remodeling is a key mechanism underlying cocaine-induced plasticity in striatum. *Neuron* 48:303-314.
- Kumar V, Fahey PG, Jong YJ, Ramanan N, O'Malley KL (2012) Activation of intracellular metabotropic glutamate receptor 5 in striatal neurons leads to up-regulation of genes associated with sustained synaptic transmission including Arc/Arg3.1 protein. *The Journal of biological chemistry* 287:5412-5425.
- Kwok RP, Lundblad JR, Chrivia JC, Richards JP, Bachinger HP, Brennan RG, Roberts SG, Green MR, Goodman RH (1994) Nuclear protein CBP is a coactivator for the transcription factor CREB. *Nature* 370:223-226.



- Lammel S, Lim BK, Ran C, Huang KW, Betley MJ, Tye KM, Deisseroth K, Malenka RC (2012) Input-specific control of reward and aversion in the ventral tegmental area. *Nature* 491:212-217.
- Larson EB, Akkentli F, Edwards S, Graham DL, Simmons DL, Alibhai IN, Nestler EJ, Self DW (2010) Striatal regulation of DeltaFosB, FosB, and cFos during cocaine self-administration and withdrawal. *Journal of neurochemistry* 115:112-122.
- Lavaur J, Bernard F, Trifilieff P, Pascoli V, Kappes V, Pages C, Vanhoutte P, Caboche J (2007) A TAT-DEF-Elk-1 peptide regulates the cytonuclear trafficking of Elk-1 and controls cytoskeleton dynamics. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 27:14448-14458.
- Lévesque M, Bédard A, Cossette M, Parent A (2003) Novel aspects of the chemical anatomy of the striatum and its efferents projections. *Journal of Chemical Neuroanatomy* 26:271-281.
- Li B, Carey M, Workman JL (2007) The role of chromatin during transcription. *Cell* 128:707-719.
- Li M, Hou YY, Lu B, Chen J, Chi ZQ, Liu JG (2009) Expression pattern of neural synaptic plasticity marker-Arc in different brain regions induced by conditioned drug withdrawal from acute morphine-dependent rats. *Acta pharmacologica Sinica* 30:282-290.
- Lim SA, Kang UJ, McGehee DS (2014) Striatal cholinergic interneuron regulation and circuit effects. *Frontiers in synaptic neuroscience* 6:22.
- Link W, Konietzko U, Kauselmann G, Krug M, Schwanke B, Frey U, Kuhl D (1995) Somatodendritic expression of an immediate early gene is regulated by synaptic activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92:5734-5738.
- Lu L, Grimm JW, Hope BT, Shaham Y (2004) Incubation of cocaine craving after withdrawal: a review of preclinical data. *Neuropharmacology* 47 Suppl 1:214-226.
- Lu L, Hope BT, Dempsey J, Liu SY, Bossert JM, Shaham Y (2005) Central amygdala ERK signaling pathway is critical to incubation of cocaine craving. *Nature neuroscience* 8:212-219.
- Lu L, Koya E, Zhai H, Hope BT, Shaham Y (2006) Role of ERK in cocaine addiction. *Trends Neurosci* 29:695-703.
- Lucas M, Frenois F, Vouillac C, Stinus L, Cador M, Le Moine C (2008) Reactivity and plasticity in the amygdala nuclei during opiate withdrawal conditioning: differential expression of c-fos and arc immediate early genes. *Neuroscience* 154:1021-1033.
- Luscher C, Malenka RC (2011) Drug-evoked synaptic plasticity in addiction: from molecular changes to circuit remodeling. *Neuron* 69:650-663.
- Luscher C, Ungless MA (2006) The mechanistic classification of addictive drugs. *PLoS medicine* 3:e437.
- Lv XF, Xu Y, Han JS, Cui CL (2011) Expression of activity-regulated cytoskeleton-associated protein (Arc/Arg3.1) in the nucleus accumbens is critical for the acquisition, expression and

reinstatement of morphine-induced conditioned place preference. Behavioural brain research 223:182-191.

Lyford GL, Yamagata K, Kaufmann WE, Barnes CA, Sanders LK, Copeland NG, Gilbert DJ, Jenkins NA, Lanahan AA, Worley PF (1995) Arc, a growth factor and activity-regulated gene, encodes a novel cytoskeleton-associated protein that is enriched in neuronal dendrites. Neuron 14:433-445.

-M-

Ma L, Chen Z, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Pandolfi PP (2005) Phosphorylation and functional inactivation of TSC2 by Erk implications for tuberous sclerosis and cancer pathogenesis. Cell 121:179-193.

Mabb AM, Je HS, Wall MJ, Robinson CG, Larsen RS, Qiang Y, Correa SA, Ehlers MD (2014) Triad3A regulates synaptic strength by ubiquitination of Arc. Neuron 82:1299-1316.

Maddox SA, Schafe GE (2011a) The activity-regulated cytoskeletal-associated protein (Arc/Arg3.1) is required for reconsolidation of a Pavlovian fear memory. The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience 31:7073-7082.

Maddox SA, Schafe GE (2011b) Epigenetic alterations in the lateral amygdala are required for reconsolidation of a Pavlovian fear memory. Learning & memory 18:579-593.

Malenka RC, Nicoll RA (1999) Long-term potentiation--a decade of progress? Science 285:1870-1874.

Marie-Claire C, Courtin C, Roques BP, Noble F (2004) Cytoskeletal genes regulation by chronic morphine treatment in rat striatum. Neuropsychopharmacology : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology 29:2208-2215.

Matamales M, Bertran-Gonzalez J, Salomon L, Degos B, Deniau JM, Valjent E, Herve D, Girault JA (2009) Striatal medium-sized spiny neurons: identification by nuclear staining and study of neuronal subpopulations in BAC transgenic mice. PloS one 4:e4770.

Mattson BJ, Bossert JM, Simmons DE, Nozaki N, Nagarkar D, Kreuter JD, Hope BT (2005) Cocaine-induced CREB phosphorylation in nucleus accumbens of cocaine-sensitized rats is enabled by enhanced activation of extracellular signal-related kinase, but not protein kinase A. Journal of neurochemistry 95:1481-1494.

Mayr B, Montminy M (2001) Transcriptional regulation by the phosphorylation-dependent factor CREB. Nature reviews Molecular cell biology 2:599-609.

Maze I, Covington HE, 3rd, Dietz DM, LaPlant Q, Renthall W, Russo SJ, Mechanic M, Mouzon E, Neve RL, Haggarty SJ, Ren Y, Sampath SC, Hurd YL, Greengard P, Tarakhovsky A, Schaefer A, Nestler EJ (2010) Essential role of the histone methyltransferase G9a in cocaine-induced plasticity. Science 327:213-216.

Maze I, Feng J, Wilkinson MB, Sun H, Shen L, Nestler EJ (2011) Cocaine dynamically regulates heterochromatin and repetitive element unsilencing in nucleus accumbens. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 108:3035-3040.

Mazzucchelli C, Vantaggiato C, Ciamei A, Fasano S, Pakhotin P, Krezel W, Welzl H, Wolfer DP, Pages G, Valverde O, Marowsky A, Porrazzo A, Orban PC, Maldonado R, Ehrenguber MU, Cestari V, Lipp HP, Chapman PF, Pouyssegur J, Brambilla R (2002) Knockout of ERK1 MAP kinase enhances synaptic plasticity in the striatum and facilitates striatal-mediated learning and memory. Neuron 34:807-820.

McClung CA, Nestler EJ (2003) Regulation of gene expression and cocaine reward by CREB and DeltaFosB. Nature neuroscience 6:1208-1215.

McClung CA, Nestler EJ (2008) Neuroplasticity mediated by altered gene expression. Neuropsychopharmacology : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology 33:3-17.

- McClung CA, Ulevy PG, Perrotti LI, Zachariou V, Berton O, Nestler EJ (2004) DeltaFosB: a molecular switch for long-term adaptation in the brain. *Brain research Molecular brain research* 132:146-154.
- McIntyre CK, Miyashita T, Setlow B, Marjon KD, Steward O, Guzowski JF, McGaugh JL (2005) Memory-influencing intra-basolateral amygdala drug infusions modulate expression of Arc protein in the hippocampus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102:10718-10723.
- McLellan AT, Lewis DC, O'Brien CP, Kleber HD (2000) Drug dependence, a chronic medical illness: implications for treatment, insurance, and outcomes evaluation. *Jama* 284:1689-1695.
- Meinhart A, Kamenski T, Hoepfner S, Baumli S, Cramer P (2005) A structural perspective of CTD function. *Genes & development* 19:1401-1415.
- Mendoza MC, Er EE, Zhang W, Ballif BA, Elliott HL, Danuser G, Blenis J (2011) ERK-MAPK drives lamellipodia protrusion by activating the WAVE2 regulatory complex. *Molecular cell* 41:661-671.
- Menniti FS, Faraci WS, Schmidt CJ (2006) Phosphodiesterases in the CNS: targets for drug development. *Nature reviews Drug discovery* 5:660-670.
- Messaoudi E, Kanhema T, Soule J, Tiron A, Dayte G, da Silva B, Bramham CR (2007) Sustained Arc/Arg3.1 synthesis controls long-term potentiation consolidation through regulation of local actin polymerization in the dentate gyrus in vivo. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 27:10445-10455.
- Miller CA, Marshall JF (2005) Molecular substrates for retrieval and reconsolidation of cocaine-associated contextual memory. *Neuron* 47:873-884.
- Miyachi S, Hasegawa YT, Gerfen CR (2005) Coincident stimulation of convergent cortical inputs enhances immediate early gene induction in the striatum. *Neuroscience* 134:1013-1022.
- Moga DE, Calhoun ME, Chowdhury A, Worley P, Morrison JH, Shapiro ML (2004) Activity-regulated cytoskeletal-associated protein is localized to recently activated excitatory synapses. *Neuroscience* 125:7-11.
- Montag-Sallaz M, Montag D (2003) Learning-induced arg 3.1/arc mRNA expression in the mouse brain. *Learning & memory* 10:99-107.
- Moratalla R, Robertson HA, Graybiel AM (1992) Dynamic regulation of NGFI-A (zif268, egr1) gene expression in the striatum. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 12:2609-2622.
- Moratalla R, Vickers EA, Robertson HA, Cochran BH, Graybiel AM (1993) Coordinate expression of c-fos and jun B is induced in the rat striatum by cocaine. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 13:423-433.
- Myrum C, Baumann A, Bustad HJ, Flydal MI, Mariaule V, Alvira S, Cuellar J, Haavik J, Soule J, Valpuesta JM, Marquez JA, Martinez A, Bramham CR (2015) Arc is a flexible modular protein capable of reversible self-oligomerization. *The Biochemical journal* 468:145-158.

-N-

- Nesse RM, Berridge KC (1997) Psychoactive drug use in evolutionary perspective. *Science* 278:63-66.
- Nestler EJ (2005) Is there a common molecular pathway for addiction? *Nature neuroscience* 8:1445-1449.
- Nicola SM, Surmeier J, Malenka RC (2000) Dopaminergic modulation of neuronal excitability in the striatum and nucleus accumbens. *Annual review of neuroscience* 23:185-215.
- Nieoullon A (2002) Dopamine and the regulation of cognition and attention. *Progress in neurobiology* 67:53-83.

-O-

- O'Brien CP (2005) Anticraving medications for relapse prevention: a possible new class of psychoactive medications. *The American journal of psychiatry* 162:1423-1431.
- O'Brien CP, Childress AR, Ehrman R, Robbins SJ (1998) Conditioning factors in drug abuse: can they explain compulsion? *Journal of psychopharmacology* 12:15-22.
- Obrdlik A, Percipalle P (2011) The F-actin severing protein cofilin-1 is required for RNA polymerase II transcription elongation. *Nucleus* 2:72-79.
- Okuno H, Akashi K, Ishii Y, Yagishita-Kyo N, Suzuki K, Nonaka M, Kawashima T, Fujii H, Takemoto-Kimura S, Abe M, Natsume R, Chowdhury S, Sakimura K, Worley PF, Bito H (2012) Inverse synaptic tagging of inactive synapses via dynamic interaction of Arc/Arg3.1 with CaMKIIbeta. *Cell* 149:886-898.
- Olds J, Milner P (1954) Positive reinforcement produced by electrical stimulation of septal area and other regions of rat brain. *Journal of comparative and physiological psychology* 47:419-427.
- Ortiz J, Harris HW, Guitart X, Terwilliger RZ, Haycock JW, Nestler EJ (1995) Extracellular signal-regulated protein kinases (ERKs) and ERK kinase (MEK) in brain: regional distribution and regulation by chronic morphine. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 15:1285-1297.

-P-

- Pandey SC, Zhang H, Ugale R, Prakash A, Xu T, Misra K (2008) Effector immediate-early gene arc in the amygdala plays a critical role in alcoholism. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 28:2589-2600.
- Panja D, Dagyte G, Bidinosti M, Wibrand K, Kristiansen AM, Sonenberg N, Bramham CR (2009) Novel translational control in Arc-dependent long term potentiation consolidation in vivo. *The Journal of biological chemistry* 284:31498-31511.
- Park S, Park JM, Kim S, Kim JA, Shepherd JD, Smith-Hicks CL, Chowdhury S, Kaufmann W, Kuhl D, Ryazanov AG, Haganir RL, Linden DJ, Worley PF (2008) Elongation factor 2 and fragile X mental retardation protein control the dynamic translation of Arc/Arg3.1 essential for mGluR-LTD. *Neuron* 59:70-83.
- Parker D, Ferreri K, Nakajima T, LaMorte VJ, Evans R, Koerber SC, Hoeger C, Montminy MR (1996) Phosphorylation of CREB at Ser-133 induces complex formation with CREB-binding protein via a direct mechanism. *Molecular and cellular biology* 16:694-703.
- Pascoli V, Besnard A, Herve D, Pages C, Heck N, Girault JA, Caboche J, Vanhoutte P (2011) Cyclic adenosine monophosphate-independent tyrosine phosphorylation of NR2B mediates cocaine-induced extracellular signal-regulated kinase activation. *Biological psychiatry* 69:218-227.
- Pascoli V, Cahill E, Bellivier F, Caboche J, Vanhoutte P (2014) Extracellular signal-regulated protein kinases 1 and 2 activation by addictive drugs: a signal toward pathological adaptation. *Biological psychiatry* 76:917-926.
- Pascoli V, Turiault M, Luscher C (2012) Reversal of cocaine-evoked synaptic potentiation resets drug-induced adaptive behaviour. *Nature* 481:71-75.
- Pascoli V, Valjent E, Corbille AG, Corvol JC, Tassin JP, Girault JA, Herve D (2005) cAMP and extracellular signal-regulated kinase signaling in response to d-amphetamine and methylphenidate in the prefrontal cortex in vivo: role of beta 1-adrenoceptors. *Molecular pharmacology* 68:421-429.
- Patterson MA, Szatmari EM, Yasuda R (2010) AMPA receptors are exocytosed in stimulated spines and adjacent dendrites in a Ras-ERK-dependent manner during long-term potentiation.

- Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 107:15951-15956.
- Paul S, Snyder GL, Yokakura H, Picciotto MR, Nairn AC, Lombroso PJ (2000) The Dopamine/D1 receptor mediates the phosphorylation and inactivation of the protein tyrosine phosphatase STEP via a PKA-dependent pathway. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 20:5630-5638.
- Paulson PE, Robinson TE (1991) Sensitization to systemic amphetamine produces an enhanced locomotor response to a subsequent intra-accumbens amphetamine challenge in rats. *Psychopharmacology (Berl)* 104:140-141.
- Peebles CL, Finkbeiner S (2007) RNA decay back in play. *Nature neuroscience* 10:1083-1084.
- Peebles CL, Yoo J, Thwin MT, Palop JJ, Noebels JL, Finkbeiner S (2010) Arc regulates spine morphology and maintains network stability in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107:18173-18178.
- Pei Q, Lewis L, Sprakes ME, Jones EJ, Grahame-Smith DG, Zetterstrom TS (2000) Serotonergic regulation of mRNA expression of Arc, an immediate early gene selectively localized at neuronal dendrites. *Neuropharmacology* 39:463-470.
- Percipalle P, Jonsson A, Nashchekin D, Karlsson C, Bergman T, Guialis A, Daneholt B (2002) Nuclear actin is associated with a specific subset of hnRNP A/B-type proteins. *Nucleic acids research* 30:1725-1734.
- Percipalle P, Simoncsits A, Zakharev S, Guarnaccia C, Sanchez R, Pongor S (1995) Rationally designed helix-turn-helix proteins and their conformational changes upon DNA binding. *The EMBO journal* 14:3200-3205.
- Percipalle P, Visa N (2006) Molecular functions of nuclear actin in transcription. *The Journal of cell biology* 172:967-971.
- Piechota J, Kolodziejczak M, Juszczak I, Sakamoto W, Janska H (2010a) Identification and characterization of high molecular weight complexes formed by matrix AAA proteases and prohibitins in mitochondria of *Arabidopsis thaliana*. *The Journal of biological chemistry* 285:12512-12521.
- Piechota M, Korostynski M, Solecki W, Gieryk A, Slezak M, Bilecki W, Ziolkowska B, Kostrzewa E, Cymerman I, Swiech L, Jaworski J, Przewlocki R (2010b) The dissection of transcriptional modules regulated by various drugs of abuse in the mouse striatum. *Genome biology* 11:R48.
- Pierce RC, Pierce-Bancroft AF, Prasad BM (1999) Neurotrophin-3 contributes to the initiation of behavioral sensitization to cocaine by activating the Ras/Mitogen-activated protein kinase signal transduction cascade. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 19:8685-8695.
- Pintchovski SA, Peebles CL, Kim HJ, Verdin E, Finkbeiner S (2009) The serum response factor and a putative novel transcription factor regulate expression of the immediate-early gene Arc/Arg3.1 in neurons. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 29:1525-1537.
- Plath N, Ohana O, Dammermann B, Errington ML, Schmitz D, Gross C, Mao X, Engelsberg A, Mahlke C, Welzl H, Kobalz U, Stawrakakis A, Fernandez E, Waltereit R, Bick-Sander A, Therstappen E, Cooke SF, Blanquet V, Wurst W, Salmen B, Bosl MR, Lipp HP, Grant SG, Bliss TV, Wolfer DP, Kuhl D (2006) Arc/Arg3.1 is essential for the consolidation of synaptic plasticity and memories. *Neuron* 52:437-444.
- Ploski JE, Pierre VJ, Smucny J, Park K, Monsey MS, Overeem KA, Schafe GE (2008) The activity-regulated cytoskeletal-associated protein (Arc/Arg3.1) is required for memory consolidation of pavlovian fear conditioning in the lateral amygdala. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 28:12383-12395.
- Praefcke GJ, McMahon HT (2004) The dynamin superfamily: universal membrane tubulation and fission molecules? *Nature reviews Molecular cell biology* 5:133-147.
- Pu L, Liu QS, Poo MM (2006) BDNF-dependent synaptic sensitization in midbrain dopamine neurons after cocaine withdrawal. *Nature neuroscience* 9:605-607.

Pulido R, Zuniga A, Ullrich A (1998) PTP-SL and STEP protein tyrosine phosphatases regulate the activation of the extracellular signal-regulated kinases ERK1 and ERK2 by association through a kinase interaction motif. *The EMBO journal* 17:7337-7350.

-Q-

Qin Y, Zhu Y, Baumgart JP, Stornetta RL, Seidenman K, Mack V, van Aelst L, Zhu JJ (2005) State-dependent Ras signaling and AMPA receptor trafficking. *Genes & development* 19:2000-2015.

Quinn RK, Brown AL, Goldie BJ, Levi EM, Dickson PW, Smith DW, Cairns MJ, Dayas CV (2015) Distinct miRNA expression in dorsal striatal subregions is associated with risk for addiction in rats. *Translational psychiatry* 5:e503.

-R-

Radwanska K, Caboche J, Kaczmarek L (2005) Extracellular signal-regulated kinases (ERKs) modulate cocaine-induced gene expression in the mouse amygdala. *The European journal of neuroscience* 22:939-948.

Radwanska K, Valjent E, Trzaskos J, Caboche J, Kaczmarek L (2006) Regulation of cocaine-induced activator protein 1 transcription factors by the extracellular signal-regulated kinase pathway. *Neuroscience* 137:253-264.

Ragozzino ME, Jih J, Tzavos A (2002) Involvement of the dorsomedial striatum in behavioral flexibility: role of muscarinic cholinergic receptors. *Brain research* 953:205-214.

Raju CS, Fukuda N, Lopez-Iglesias C, Goritz C, Visa N, Percipalle P (2011) In neurons, activity-dependent association of dendritically transported mRNA transcripts with the transacting factor CBF-A is mediated by A2RE/RTS elements. *Molecular biology of the cell* 22:1864-1877.

Raman M, Chen W, Cobb MH (2007) Differential regulation and properties of MAPKs. *Oncogene* 26:3100-3112.

Ramirez-Amaya V, Marrone DF, Gage FH, Worley PF, Barnes CA (2006) Integration of new neurons into functional neural networks. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 26:12237-12241.

Rao VR, Pintchovski SA, Chin J, Peebles CL, Mitra S, Finkbeiner S (2006) AMPA receptors regulate transcription of the plasticity-related immediate-early gene *Arc*. *Nature neuroscience* 9:887-895.

Ray LB, Sturgill TW (1988) Characterization of insulin-stimulated microtubule-associated protein kinase. Rapid isolation and stabilization of a novel serine/threonine kinase from 3T3-L1 cells. *The Journal of biological chemistry* 263:12721-12727.

Ren Z, Sun WL, Jiao H, Zhang D, Kong H, Wang X, Xu M (2010) Dopamine D1 and N-methyl-D-aspartate receptors and extracellular signal-regulated kinase mediate neuronal morphological changes induced by repeated cocaine administration. *Neuroscience* 168:48-60.

Renthal W, Maze I, Krishnan V, Covington HE, 3rd, Xiao G, Kumar A, Russo SJ, Graham A, Tsankova N, Kippin TE, Kerstetter KA, Neve RL, Haggarty SJ, McKinsey TA, Bassel-Duby R, Olson EN, Nestler EJ (2007) Histone deacetylase 5 epigenetically controls behavioral adaptations to chronic emotional stimuli. *Neuron* 56:517-529.

Renthal W, Nestler EJ (2008) Epigenetic mechanisms in drug addiction. *Trends in molecular medicine* 14:341-350.

Reynolds JN, Wickens JR (2002) Dopamine-dependent plasticity of corticostriatal synapses. *Neural networks : the official journal of the International Neural Network Society* 15:507-521.

- Rial Verde EM, Lee-Osbourne J, Worley PF, Malinow R, Cline HT (2006) Increased expression of the immediate-early gene *arc/arg3.1* reduces AMPA receptor-mediated synaptic transmission. *Neuron* 52:461-474.
- Richter JD, Sonenberg N (2005) Regulation of cap-dependent translation by eIF4E inhibitory proteins. *Nature* 433:477-480.
- Ritz MC, Lamb RJ, Goldberg SR, Kuhar MJ (1987) Cocaine receptors on dopamine transporters are related to self-administration of cocaine. *Science* 237:1219-1223.
- Robbins TW, Everitt BJ (2002) Limbic-striatal memory systems and drug addiction. *Neurobiology of learning and memory* 78:625-636.
- Robinson S, Sandstrom SM, Denenberg VH, Palmiter RD (2005) Distinguishing whether dopamine regulates liking, wanting, and/or learning about rewards. *Behavioral neuroscience* 119:5-15.
- Robinson TE, Berridge KC (2001) Incentive-sensitization and addiction. *Addiction* 96:103-114.
- Robinson TE, Berridge KC (2003) Addiction. *Annual review of psychology* 54:25-53.
- Robinson TE, Berridge KC (2008) Review. The incentive sensitization theory of addiction: some current issues. *Philosophical transactions of the Royal Society of London Series B, Biological sciences* 363:3137-3146.
- Robinson TE, Kolb B (1999) Alterations in the morphology of dendrites and dendritic spines in the nucleus accumbens and prefrontal cortex following repeated treatment with amphetamine or cocaine. *The European journal of neuroscience* 11:1598-1604.
- Robison AJ, Nestler EJ (2011) Transcriptional and epigenetic mechanisms of addiction. *Nature reviews Neuroscience* 12:623-637.
- Rochefort NL, Konnerth A (2012) Dendritic spines: from structure to in vivo function. *EMBO reports* 13:699-708.
- Rodriguez JJ, Davies HA, Silva AT, De Souza IE, Peddie CJ, Colyer FM, Lancashire CL, Fine A, Errington ML, Bliss TV, Stewart MG (2005) Long-term potentiation in the rat dentate gyrus is associated with enhanced *Arc/Arg3.1* protein expression in spines, dendrites and glia. *The European journal of neuroscience* 21:2384-2396.
- Rudinskiy N, Hawkes JM, Betensky RA, Eguchi M, Yamaguchi S, Spires-Jones TL, Hyman BT (2012) Orchestrated experience-driven *Arc* responses are disrupted in a mouse model of Alzheimer's disease. *Nature neuroscience* 15:1422-1429.
- Russo SJ, Dietz DM, Dumitriu D, Morrison JH, Malenka RC, Nestler EJ (2010) The addicted synapse: mechanisms of synaptic and structural plasticity in nucleus accumbens. *Trends Neurosci* 33:267-276.



- Saha RN, Wissink EM, Bailey ER, Zhao M, Fargo DC, Hwang JY, Daigle KR, Fenn JD, Adelman K, Dudek SM (2011) Rapid activity-induced transcription of *Arc* and other IEGs relies on poised RNA polymerase II. *Nature neuroscience* 14:848-856.
- Salzmann J, Marie-Claire C, Le Guen S, Roques BP, Noble F (2003) Importance of ERK activation in behavioral and biochemical effects induced by MDMA in mice. *British journal of pharmacology* 140:831-838.
- Samaha AN, Mallet N, Ferguson SM, Gonon F, Robinson TE (2004) The rate of cocaine administration alters gene regulation and behavioral plasticity: implications for addiction. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 24:6362-6370.
- Sarmiere PD, Bamburg JR (2004) Regulation of the neuronal actin cytoskeleton by ADF/cofilin. *Journal of neurobiology* 58:103-117.
- Sassone-Corsi P, Mizzen CA, Cheung P, Crosio C, Monaco L, Jacquot S, Hanauer A, Allis CD (1999) Requirement of Rsk-2 for epidermal growth factor-activated phosphorylation of histone H3. *Science* 285:886-891.

- Scheetz AJ, Constantine-Paton M (1994) Modulation of NMDA receptor function: implications for vertebrate neural development. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 8:745-752.
- Schiltz CA, Kelley AE, Landry CF (2005) Contextual cues associated with nicotine administration increase arc mRNA expression in corticolimbic areas of the rat brain. *The European journal of neuroscience* 21:1703-1711.
- Schrader LA, Birnbaum SG, Nadin BM, Ren Y, Bui D, Anderson AE, Sweatt JD (2006) ERK/MAPK regulates the Kv4.2 potassium channel by direct phosphorylation of the pore-forming subunit. *American journal of physiology Cell physiology* 290:C852-861.
- Schultz W (2000) Multiple reward signals in the brain. *Nature reviews Neuroscience* 1:199-207.
- Schultz W (2006) Behavioral theories and the neurophysiology of reward. *Annual review of psychology* 57:87-115.
- Schultz W, Dayan P, Montague PR (1997) A neural substrate of prediction and reward. *Science* 275:1593-1599.
- Serres F, Rodriguez M, Rivet JM, Galizzi JP, Lockhart B, Sharp T, Millan MJ (2012) Blockade of alpha2-adrenoceptors induces Arc gene expression in rat brain in a glutamate receptor-dependent manner: a combined qPCR, in situ hybridisation and immunocytochemistry study. *Neuropharmacology* 63:992-1001.
- Sheng M, Greenberg ME (1990) The regulation and function of c-fos and other immediate early genes in the nervous system. *Neuron* 4:477-485.
- Shepherd JD, Bear MF (2011) New views of Arc, a master regulator of synaptic plasticity. *Nature neuroscience* 14:279-284.
- Shepherd JD, Rumbaugh G, Wu J, Chowdhury S, Plath N, Kuhl D, Huganir RL, Worley PF (2006) Arc/Arg3.1 mediates homeostatic synaptic scaling of AMPA receptors. *Neuron* 52:475-484.
- Smith-Hicks C, Xiao B, Deng R, Ji Y, Zhao X, Shepherd JD, Posern G, Kuhl D, Huganir RL, Ginty DD, Worley PF, Linden DJ (2010) SRF binding to SRE 6.9 in the Arc promoter is essential for LTD in cultured Purkinje cells. *Nature neuroscience* 13:1082-1089.
- Smith AD, Bolam JP (1990) The neural network of the basal ganglia as revealed by the study of synaptic connections of identified neurones. *Trends Neurosci* 13:259-265.
- Snyder GL, Fienberg AA, Huganir RL, Greengard P (1998) A dopamine/D1 receptor/protein kinase A/dopamine- and cAMP-regulated phosphoprotein (Mr 32 kDa)/protein phosphatase-1 pathway regulates dephosphorylation of the NMDA receptor. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 18:10297-10303.
- Song SD, Tang HF (2014) [Progress in PDE4 targeted therapy for inflammatory diseases]. *Zhejiang da xue xue bao Yi xue ban = Journal of Zhejiang University Medical sciences* 43:353-358.
- Steward O, Wallace CS, Lyford GL, Worley PF (1998) Synaptic activation causes the mRNA for the IEG Arc to localize selectively near activated postsynaptic sites on dendrites. *Neuron* 21:741-751.
- Steward O, Worley PF (2001a) A cellular mechanism for targeting newly synthesized mRNAs to synaptic sites on dendrites. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98:7062-7068.
- Steward O, Worley PF (2001b) Selective targeting of newly synthesized Arc mRNA to active synapses requires NMDA receptor activation. *Neuron* 30:227-240.
- Sun WL, Zhou L, Hazim R, Quinones-Jenab V, Jenab S (2007) Effects of acute cocaine on ERK and DARPP-32 phosphorylation pathways in the caudate-putamen of Fischer rats. *Brain research* 1178:12-19.
- Sutton MA, Beninger RJ (1999) Psychopharmacology of conditioned reward: evidence for a rewarding signal at D1-like dopamine receptors. *Psychopharmacology (Berl)* 144:95-110.
- Swanson LW (2000) Cerebral hemisphere regulation of motivated behavior. *Brain research* 886:113-164.
- Sweatt JD (2004) Mitogen-activated protein kinases in synaptic plasticity and memory. *Current opinion in neurobiology* 14:311-317.

-T-

- Taber KH, Black DN, Porrino LJ, Hurley RA (2012) Neuroanatomy of dopamine: reward and addiction. *The Journal of neuropsychiatry and clinical neurosciences* 24:1-4.
- Tan A, Moratalla R, Lyford GL, Worley P, Graybiel AM (2000) The activity-regulated cytoskeletal-associated protein arc is expressed in different striosome-matrix patterns following exposure to amphetamine and cocaine. *Journal of neurochemistry* 74:2074-2078.
- Teber I, Kohling R, Speckmann EJ, Barnekow A, Kremerskothen J (2004) Muscarinic acetylcholine receptor stimulation induces expression of the activity-regulated cytoskeleton-associated gene (ARC). *Brain research Molecular brain research* 121:131-136.
- Tepper JM, Bolam JP (2004) Functional diversity and specificity of neostriatal interneurons. *Current opinion in neurobiology* 14:685-692.
- Thomas GM, Huganir RL (2004) MAPK cascade signalling and synaptic plasticity. *Nature reviews Neuroscience* 5:173-183.
- Thomson S, Clayton AL, Hazzalin CA, Rose S, Barratt MJ, Mahadevan LC (1999a) The nucleosomal response associated with immediate-early gene induction is mediated via alternative MAP kinase cascades: MSK1 as a potential histone H3/HMG-14 kinase. *The EMBO journal* 18:4779-4793.
- Thomson S, Mahadevan LC, Clayton AL (1999b) MAP kinase-mediated signalling to nucleosomes and immediate-early gene induction. *Seminars in cell & developmental biology* 10:205-214.
- Tiffany ST (1999) Cognitive concepts of craving. *Alcohol research & health : the journal of the National Institute on Alcohol Abuse and Alcoholism* 23:215-224.
- Toda S, Shen HW, Peters J, Cagle S, Kalivas PW (2006) Cocaine increases actin cycling: effects in the reinstatement model of drug seeking. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 26:1579-1587.
- Treisman R (1995) Journey to the surface of the cell: Fos regulation and the SRE. *The EMBO journal* 14:4905-4913.
- Treisman R (1996) Regulation of transcription by MAP kinase cascades. *Current opinion in cell biology* 8:205-215.
- Trifilieff P, Lavour J, Pascoli V, Kappes V, Brami-Cherrier K, Pages C, Micheau J, Caboche J, Vanhoutte P (2009) Endocytosis controls glutamate-induced nuclear accumulation of ERK. *Molecular and cellular neurosciences* 41:325-336.
- Tsui CC, Copeland NG, Gilbert DJ, Jenkins NA, Barnes C, Worley PF (1996) Narp, a novel member of the pentraxin family, promotes neurite outgrowth and is dynamically regulated by neuronal activity. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 16:2463-2478.
- Turrigiano GG (2008) The self-tuning neuron: synaptic scaling of excitatory synapses. *Cell* 135:422-435.
- Ueda K, Kosako H, Fukui Y, Hattori S (2004a) Proteomic identification of Bcl2-associated athanogene 2 as a novel MAPK-activated protein kinase 2 substrate. *The Journal of biological chemistry* 279:41815-41821.

-U-

- Ueda T, Watanabe-Fukunaga R, Fukuyama H, Nagata S, Fukunaga R (2004b) Mnk2 and Mnk1 are essential for constitutive and inducible phosphorylation of eukaryotic initiation factor 4E but not for cell growth or development. *Molecular and cellular biology* 24:6539-6549.

-V-

- Valjent E, Bertran-Gonzalez J, Herve D, Fisone G, Girault JA (2009) Looking BAC at striatal signaling: cell-specific analysis in new transgenic mice. *Trends Neurosci* 32:538-547.
- Valjent E, Corbille AG, Bertran-Gonzalez J, Herve D, Girault JA (2006a) Inhibition of ERK pathway or protein synthesis during reexposure to drugs of abuse erases previously learned place preference. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103:2932-2937.
- Valjent E, Corvol JC, Pages C, Besson MJ, Maldonado R, Caboche J (2000) Involvement of the extracellular signal-regulated kinase cascade for cocaine-rewarding properties. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 20:8701-8709.
- Valjent E, Corvol JC, Trzaskos JM, Girault JA, Herve D (2006b) Role of the ERK pathway in psychostimulant-induced locomotor sensitization. *BMC neuroscience* 7:20.
- Valjent E, Pages C, Herve D, Girault JA, Caboche J (2004) Addictive and non-addictive drugs induce distinct and specific patterns of ERK activation in mouse brain. *The European journal of neuroscience* 19:1826-1836.
- Valjent E, Pages C, Rogard M, Besson MJ, Maldonado R, Caboche J (2001) Delta 9-tetrahydrocannabinol-induced MAPK/ERK and Elk-1 activation in vivo depends on dopaminergic transmission. *The European journal of neuroscience* 14:342-352.
- Valjent E, Pascoli V, Svenningsson P, Paul S, Enslen H, Corvol JC, Stipanovich A, Caboche J, Lombroso PJ, Nairn AC, Greengard P, Herve D, Girault JA (2005) Regulation of a protein phosphatase cascade allows convergent dopamine and glutamate signals to activate ERK in the striatum. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102:491-496.
- Vazdarjanova A, McNaughton BL, Barnes CA, Worley PF, Guzowski JF (2002) Experience-dependent coincident expression of the effector immediate-early genes *arc* and *Homer 1a* in hippocampal and neocortical neuronal networks. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 22:10067-10071.
- Vazdarjanova A, Ramirez-Amaya V, Insel N, Plummer TK, Rosi S, Chowdhury S, Mikhael D, Worley PF, Guzowski JF, Barnes CA (2006) Spatial exploration induces *ARC*, a plasticity-related immediate-early gene, only in calcium/calmodulin-dependent protein kinase II-positive principal excitatory and inhibitory neurons of the rat forebrain. *The Journal of comparative neurology* 498:317-329.
- Visa N, Percipalle P (2010) Nuclear functions of actin. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 2:a000620.
- Volmat V, Pouyssegur J (2001) Spatiotemporal regulation of the p42/p44 MAPK pathway. *Biology of the cell / under the auspices of the European Cell Biology Organization* 93:71-79.
- Voorn P, Vanderschuren LJ, Groenewegen HJ, Robbins TW, Pennartz CM (2004) Putting a spin on the dorsal-ventral divide of the striatum. *Trends Neurosci* 27:468-474.

-W-

- Walker DM, Cates HM, Heller EA, Nestler EJ (2015) Regulation of chromatin states by drugs of abuse. *Current opinion in neurobiology* 30:112-121.
- Wallace CS, Lyford GL, Worley PF, Steward O (1998) Differential intracellular sorting of immediate early gene mRNAs depends on signals in the mRNA sequence. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 18:26-35.
- Waltereit R, Dammermann B, Wulff P, Scafidi J, Staubli U, Kauselmann G, Bundman M, Kuhl D (2001) *Arg3.1/Arc* mRNA induction by Ca^{2+} and cAMP requires protein kinase A and mitogen-

- activated protein kinase/extracellular regulated kinase activation. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 21:5484-5493.
- Wang KH, Majewska A, Schummers J, Farley B, Hu C, Sur M, Tonegawa S (2006) In vivo two-photon imaging reveals a role of arc in enhancing orientation specificity in visual cortex. *Cell* 126:389-402.
- Wang Y, Zheng F, Zhou X, Sun Z, Wang H (2009) Converging signal on ERK1/2 activity regulates group I mGluR-mediated Arc transcription. *Neuroscience letters* 460:36-40.
- Watabe-Uchida M, Zhu L, Ogawa SK, Vamanrao A, Uchida N (2012) Whole-brain mapping of direct inputs to midbrain dopamine neurons. *Neuron* 74:858-873.
- Waung MW, Pfeiffer BE, Nosyreva ED, Ronesi JA, Huber KM (2008) Rapid translation of Arc/Arg3.1 selectively mediates mGluR-dependent LTD through persistent increases in AMPAR endocytosis rate. *Neuron* 59:84-97.
- Wee CL, Teo S, Oey NE, Wright GD, VanDongen HMA, VanDongen AMJ (2014) Nuclear Arc Interacts with the Histone Acetyltransferase Tip60 to Modify H4K12 Acetylation. *eNeuro* 1.
- Wickens JR (2009) Synaptic plasticity in the basal ganglia. *Behavioural brain research* 199:119-128.
- Wise RA (1998) Drug-activation of brain reward pathways. *Drug and alcohol dependence* 51:13-22.
- Wise RA (2005) Forebrain substrates of reward and motivation. *The Journal of comparative neurology* 493:115-121.
- Wise RA, Bozarth MA (1987) A psychomotor stimulant theory of addiction. *Psychological review* 94:469-492.
- Wise RA, Schwartz HV (1981) Pimozide attenuates acquisition of lever-pressing for food in rats. *Pharmacology, biochemistry, and behavior* 15:655-656.
- Wise SP, Murray EA, Gerfen CR (1996) The frontal cortex-basal ganglia system in primates. *Critical reviews in neurobiology* 10:317-356.
- Wolf I, Rubinfeld H, Yoon S, Marmor G, Hanoch T, Seger R (2001) Involvement of the activation loop of ERK in the detachment from cytosolic anchoring. *The Journal of biological chemistry* 276:24490-24497.
- Wolf ME (1998) The role of excitatory amino acids in behavioral sensitization to psychomotor stimulants. *Progress in neurobiology* 54:679-720.
- Worley PF, Christy BA, Nakabeppu Y, Bhat RV, Cole AJ, Baraban JM (1991) Constitutive expression of zif268 in neocortex is regulated by synaptic activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 88:5106-5110.

-X-

- Xing J, Ginty DD, Greenberg ME (1996) Coupling of the RAS-MAPK pathway to gene activation by RSK2, a growth factor-regulated CREB kinase. *Science* 273:959-963.

-Y-

- Yagishita S, Hayashi-Takagi A, Ellis-Davies GC, Urakubo H, Ishii S, Kasai H (2014) A critical time window for dopamine actions on the structural plasticity of dendritic spines. *Science* 345:1616-1620.
- Yamagata K, Sanders LK, Kaufmann WE, Yee W, Barnes CA, Nathans D, Worley PF (1994) rheb, a growth factor- and synaptic activity-regulated gene, encodes a novel Ras-related protein. *The Journal of biological chemistry* 269:16333-16339.
- Yap JJ, Chartoff EH, Holly EN, Potter DN, Carlezon WA, Jr., Miczek KA (2015) Social defeat stress-induced sensitization and escalated cocaine self-administration: the role of ERK signaling in the rat ventral tegmental area. *Psychopharmacology (Berl)* 232:1555-1569.

- Yasuda M, Fukuchi M, Tabuchi A, Kawahara M, Tsuneki H, Azuma Y, Chiba Y, Tsuda M (2007) Robust stimulation of TrkB induces delayed increases in BDNF and Arc mRNA expressions in cultured rat cortical neurons via distinct mechanisms. *Journal of neurochemistry* 103:626-636.
- Yin Y, Edelman GM, Vanderklish PW (2002) The brain-derived neurotrophic factor enhances synthesis of Arc in synaptoneurosomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99:2368-2373.
- Ying SW, Futter M, Rosenblum K, Webber MJ, Hunt SP, Bliss TV, Bramham CR (2002) Brain-derived neurotrophic factor induces long-term potentiation in intact adult hippocampus: requirement for ERK activation coupled to CREB and upregulation of Arc synthesis. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 22:1532-1540.
- Yokel RA, Wise RA (1975) Increased lever pressing for amphetamine after pimozide in rats: implications for a dopamine theory of reward. *Science* 187:547-549.
- Yuferov V, Krosiak T, Laforge KS, Zhou Y, Ho A, Kreek MJ (2003) Differential gene expression in the rat caudate putamen after "binge" cocaine administration: advantage of triplicate microarray analysis. *Synapse* 48:157-169.



- Zachariou V, Sgambato-Faure V, Sasaki T, Svenningsson P, Berton O, Fienberg AA, Nairn AC, Greengard P, Nestler EJ (2006) Phosphorylation of DARPP-32 at Threonine-34 is required for cocaine action. *Neuropsychopharmacology : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology* 31:555-562.
- Zalfa F, Giorgi M, Primerano B, Moro A, Di Penta A, Reis S, Oostra B, Bagni C (2003) The fragile X syndrome protein FMRP associates with BC1 RNA and regulates the translation of specific mRNAs at synapses. *Cell* 112:317-327.
- Zavala AR, Osredkar T, Joyce JN, Neisewander JL (2008) Upregulation of Arc mRNA expression in the prefrontal cortex following cue-induced reinstatement of extinguished cocaine-seeking behavior. *Synapse* 62:421-431.
- Zhai H, Li Y, Wang X, Lu L (2008) Drug-induced alterations in the extracellular signal-regulated kinase (ERK) signalling pathway: implications for reinforcement and reinstatement. *Cellular and molecular neurobiology* 28:157-172.
- Zhang Y, Loonam TM, Noailles PA, Angulo JA (2001) Comparison of cocaine- and methamphetamine-evoked dopamine and glutamate overflow in somatodendritic and terminal field regions of the rat brain during acute, chronic, and early withdrawal conditions. *Annals of the New York Academy of Sciences* 937:93-120.
- Zhu JJ, Qin Y, Zhao M, Van Aelst L, Malinow R (2002) Ras and Rap control AMPA receptor trafficking during synaptic plasticity. *Cell* 110:443-455.

ANNEXES

ANNEXES

ANNEXE 1 : Revue publiée dans Froniers in Pharmacology (2014)

Convergence of dopamine and glutamate signaling onto striatal ERK activation in response to drugs of abuse

Emma Cahill, Marine Salery, Peter Vanhoutte, Jocelyne Caboche

ANNEXE 2 : Article de recherche publié dans Brain Strutcure and Function, (2015)

A new automated 3D detection of synaptic contacts reveals the formation of cortico-striatal synapses upon cocaine treatment in vivo

Nicolas Heck Marc Dos Santos, Brahim Amairi, Marine Salery, Antoine Besnard, Etienne Herzog, Thomas Boudier, Peter Vanhoutte, Jocelyne Caboche



Convergence of dopamine and glutamate signaling onto striatal ERK activation in response to drugs of abuse

Emma Cahill^{1,2,3}, Marine Salery^{1,2,3}, Peter Vanhoutte^{1,2,3} and Jocelyne Caboche^{1,2,3} *

¹ UMRS 952, INSERM, Physiopathologie des Maladies du Système Nerveux Central, Paris, France

² UMR7224, CNRS, Physiopathologie des Maladies du Système Nerveux Central, Paris, France

³ University Pierre and Marie Curie-Paris 6, Paris, France

Edited by:

Maria Grazia Cascio, University of Aberdeen, UK

Reviewed by:

Micaela Morelli, University of Cagliari, Italy

Riccardo Brambilla, San Raffaele Scientific Institute and University, Italy

*Correspondence:

Jocelyne Caboche, UMRS 952/UMR7224, Signalisation Intracellulaire et Neuroadaptations, Université Pierre et Marie Curie-Paris 06, Paris 75005, France
e-mail: jocelyne.caboche@snv.jussieu.fr

Despite their distinct targets, all addictive drugs commonly abused by humans evoke increases in dopamine (DA) concentration within the striatum. The main DA Guanine nucleotide binding protein couple receptors (GPCRs) expressed by medium-sized spiny neurons of the striatum are the D1R and D2R, which are positively and negatively coupled to cyclic adenosine monophosphate (cAMP)/protein kinase A (PKA) signaling, respectively. These two DA GPCRs are largely segregated into distinct neuronal populations, where they are co-expressed with glutamate receptors in dendritic spines. Direct and indirect interactions between DA GPCRs and glutamate receptors are the molecular basis by which DA modulates glutamate transmission and controls striatal plasticity and behavior induced by drugs of abuse. A major downstream target of striatal D1R is the extracellular signal-regulated kinase (ERK) kinase pathway. ERK activation by drugs of abuse behaves as a key integrator of D1R and glutamate NMDAR signaling. Once activated, ERK can trigger chromatin remodeling and induce gene expression that permits long-term cellular alterations and drug-induced morphological and behavioral changes. Besides the classical cAMP/PKA pathway, downstream of D1R, recent evidence implicates a cAMP-independent crosstalk mechanism by which the D1R potentiates NMDAR-mediated calcium influx and ERK activation. The mounting evidence of reciprocal modulation of DA and glutamate receptors adds further intricacy to striatal synaptic signaling and is liable to prove relevant for addictive drug-induced signaling, plasticity, and behavior. Herein, we review the evidence that built our understanding of the consequences of this synergistic signaling for the actions of drugs of abuse.

Keywords: receptors, addiction, dopamine, crosstalk, signaling, ERK, GPCR, striatum

INTRODUCTION

Drug addiction can be considered as a chronic and relapsing psychiatric disorder induced by repeated pharmacological manipulation of the so-called mesolimbic reward circuitry by drugs of abuse. It can be viewed as maladaptive neural plasticity that occurs in vulnerable individuals in response to repeated exposure to drugs. Thus, addictive drugs change brain properties that normally permit us to adapt to environmental stimuli (Kelley, 2004; Everitt and Robbins, 2005). By changing motivational circuitry, addictive drugs progressively orient behavior toward drug-seeking and drug-taking strategies that are life-long behavioral changes (Hyman et al., 2006). The persistence of these behavioral changes relies on alterations in gene expression, an important mechanism by which chronic exposure to a drug of abuse elicits long-lasting plasticity in the brain. All drugs of abuse enhance extracellular dopamine (DA) levels in the forebrain, especially in the ventral part of the striatum, the nucleus accumbens (NAcc; Di Chiara and Imperato, 1988), where they control transcription and new protein synthesis (Robinson and Nestler, 2011) within medium-sized spiny neurons (MSNs), the major striatal neuron population. These DA inputs are normally activated in response to unpredicted rewards (Schultz, 2010), and control

glutamatergic striatal inputs that are informative of the context. By hijacking DA release, drugs of abuse drive cortico-striatal plasticity (Wickens, 2009). The search for therapeutic targets to treat addiction has been recently encouraged by the discovery of new cellular and molecular substrates of DA-driven signaling in the striatum.

The main DA GPCRs expressed by MSNs of the striatum are the D1R and D2R, which are positively and negatively coupled to cyclic adenosine monophosphate (cAMP)/protein kinase A (PKA) signaling, respectively. However, besides these classical signaling pathways, it now becomes evident that direct and indirect interactions between DA-R and glutamate receptors are the molecular basis by which DA controls striatal plasticity and behavior induced by drugs of abuse. The extracellular signal-regulated kinase (ERK) signaling pathway, which is activated in a DA-D1R and NMDAR dependent manner in MSNs in response to drugs of abuse, forms the central core of striatal plasticity and adaptive behaviors in response to these drugs (Girault et al., 2007). We review herein evidence from the literature indicating that D1R-glutamate convergence onto ERK signaling in the striatum is a critical event onto striatal plasticity in response to drugs of abuse.

STRIATAL MSN AT THE JUNCTION OF DA AND GLUTAMATE TRANSMISSION

THE DA AND GLUTAMATE HYPOTHESES OF ADDICTION

Despite their different principal targets of action, common drugs of abuse have a shared secondary consequence on DA transmission (Di Chiara and Imperato, 1988). Dialysis for extracellular levels of DA in the striatum revealed large increases from basal levels by administration of drugs abused by humans including cocaine, amphetamine, and morphine. This increase in DA levels is significantly higher in the ventral region, NAcc, than in the dorsal part. Both regions receive dense DA afferents from the ventral tegmental area (VTA). In a physiological context, DA transmission in the striatum influences motor control, decision making, attention and working memory, and learning of reward associated stimuli (Robbins and Everitt, 2002). Therefore, it is believed to be involved in disorders where these processes are perturbed such as Parkinson's disease (PD), Huntington's disease, attention deficit hyperactivity disorder (ADHD), schizophrenia, Tourette's syndrome as well as addiction. The DA hypothesis of addiction has gained significant support but the precise role of DA in reward anticipation and motivation is still under intense investigation (Wise and Bozarth, 1987). DA transmission is not believed to register the context of the drug experience, rather it is an associative learning performed by cortical and subcortical glutamatergic innervations to the striatum, which supports this (Hyman et al., 2006). While an acute treatment with drugs such as cocaine does not drastically alter the concentration of glutamate liberated in the striatum, the repeated administration or self-administration of drugs results in a potentiated glutamate availability at the synapse (Pierce et al., 1996; Zhang et al., 2001). This loss of control of glutamate transmission has been proposed to underlie the shift in behavioral control that is seen after repeated drug treatment (Kalivas, 2009). Importantly these two important transmission systems engaged by drugs of abuse, namely DA and glutamate, converge anatomically in the striatum.

MEDIUM-SIZED SPINY NEURONS INTEGRATE DA AND GLUTAMATE SIGNALS

The DA and glutamatergic inputs converge onto the dendrites of the major cell type of the striatum, the MSN. The GABAergic MSNs are generally divided into two groups, based in part on their expression of either the DA D1 receptor (the D1R) or the D2 receptor (D2R; Gerfen et al., 1990). Each MSN population controls the striatal inhibitory output to different basal ganglia structures forming the direct, D1 expressing, and indirect, D2 expressing, striatal projection pathways and are both acted on by exposure to drugs of abuse (Smith et al., 2013). The MSN of the direct pathway inhibit the substantia nigra reticulata (SNr) neurons, which are GABAergic neurons with high basal firing rate. The MSNs of the indirect pathway have an opposite effect because of their inhibitory link formed by projections to the external globus pallidus (GPe; GABAergic), which in turn projects to the subthalamic nucleus (STN; Glutamatergic). Therefore the indirect pathway leads to the disinhibition of SNr. Activation of the direct striatonigral pathway disinhibits thalamocortical neurons. The indirect pathway has the opposite effect. DA reinforces the direct pathway and inhibits the indirect pathway, leading

to harmonious functions of the basal ganglia. Recent evidence, using genetically encoded calcium sensors, has confirmed original assumptions that a balance exists between the direct and indirect pathway and that generation of movements requires the initiation and selection of wanted motor behaviors (Carlezon et al., 1998; Cui et al., 2013). This is supported by studies where either population were artificially activated using light activated Channel rodopsin. Impressively, when the direct pathway was activated in this manner the mice produced more ambulation in an open field and, accordingly, the activation of the indirect pathway lead to an inhibition of movement (Kravitz et al., 2010). Both pathways are acted on by DA, and while a combinatorial effect is undoubtedly central for the actions of drugs of abuse many studies have highlighted the antagonist relationship between them (recently reviewed Lobo and Nestler, 2011). In general terms, the activation of the D1R expressing MSNs promotes initiation of motor behaviors along with drug reward and sensitizing properties, while the D2R seem to exert an inhibitory influence on these behaviors.

STRIATAL DA RECEPTORS

Dopamine transmission is detected by Guanine nucleotide binding protein couple receptors (GPCRs), also known as seven-transmembrane receptors. These are metabotropic receptors share features such as the interaction with G-proteins, from which they gain their name, and the seven alpha-helices transmembrane domain structure that are interconnected by alternating intracellular and extracellular loops. The heterotrimeric G-proteins are formed by a combination of an α -subunit and $\beta\gamma$ dimer, that can each lead to activation of signaling effectors. Exactly how the DA receptors couple to the G-proteins is not yet fully understood, but two models have been proposed (Lohse et al., 2008).

The striatum contains all the subtypes of DA GPCR to different extents (Missale et al., 1998). Since the late 1970s the DA receptors have been subdivided into two families, originally based on the prediction that one family is positively coupled to adenylyl cyclase via Gs proteins and cAMP production, and the other to its inhibition via Gi proteins (Kebabian and Calne, 1979). After the identification of D1 and D2 receptors came the molecular cloning and the subsequent discovery of a D3, D4, and D5 (previously known as the D1b in the rat). The D1R, D2R (Le Moine and Bloch, 1995), and D5R (Rivera et al., 2002) are expressed both in the dorsal and ventral striatum, while the D3 is preferentially expressed in the ventral striatum (Lévesque et al., 1992). The D4R, relatively speaking, is not as strongly expressed but is detectable in the striatum (Ariano et al., 1997).

Focus on striatal D1R: regulation by drugs of abuse

As already stated, there is a segregation of D1R and D2R expression in the two populations of MSNs. These two founding members of the DA receptor family are GPCR that are distinguished on the basis of their coupling to cAMP production and PKA-mediated signaling (Neve et al., 2004). Although a population of MSN exists that co-express D1R and D2R, the exact percentage seems to depend on the method of analysis, however, estimates are in the region of 17% in the ventral striatum (Bertran-Gonzalez et al., 2008). Accumulated evidence suggests that from the first

drug exposure, essential signaling, and transcriptional events necessary for drug-induced alterations in behavior are set in motion primarily in D1R + MSN of the “direct” or striato-nigral pathway (Valjent et al., 2000; Bertran-Gonzalez et al., 2008).

The D1R is expressed in the major brain regions of the reinforcement learning circuitry (i.e., the cerebral cortex, limbic system, thalamus) and within the striatum it is strongly expressed in both dorsal and ventral regions. At the cellular level, the D1R localizes principally along the perisynaptic neck regions of dendritic spines (Huang et al., 1992). A similar conclusion was drawn from immunohistochemical analysis of cortical tissue from humans and primates where the D1R signal was more “extrasynaptic” (Smiley et al., 1994). In striatal spines, the D1R come into close proximity with the glutamate receptors at the post synaptic density (PSD), and they are extensively interconnected via scaffold proteins and intracellular signaling proteins.

Pre-treatment with SCH23390, a D1R antagonist, inhibited acute cocaine-induced locomotor activity and prevented the development of locomotor sensitization in a “one-shot” protocol (Fontana et al., 1993; White et al., 1998). Later studies confirmed that SCH23390 but not D2R antagonist raclopride, prevented the development of locomotor sensitization to cocaine, and furthermore a contribution of the NMDAR to this behavior was identified (Valjent et al., 2000).

Two lines of D1R KO mice lacked the acute locomotor and stereotyped behaviors normally induced by cocaine (Xu et al., 1994; Miner et al., 1995). This altered response was specific to D1R homozygous knockout mice since heterozygous mice still responded (Miner et al., 1995). In a further study, the chronic effects of cocaine were also perturbed, as the animals did not show sensitization of the locomotor activity after repeated cocaine administration (Xu et al., 2000). However, the D1R KO have hyper basal-locomotor activity, which remained elevated in these studies, so the use of a locomotor readout for cocaine’s effects may not be as relevant as other measures. Although D1R KO mice developed a normal conditioned place preference (CPP) to cocaine (Miner et al., 1995), they did not develop self-administration of cocaine, despite having learned sufficiently the operant association for food (Caine et al., 2007). The D1R contribution to self-administration therefore appeared to be function of the reward and whether context or operant reward learning is recruited relied differentially on functional D1R.

STRIATAL GLUTAMATE RECEPTORS

The striatum receives vast glutamatergic inputs from cortical and subcortical regions, which converge anatomically with the DA inputs. Early studies used various antagonists of glutamate receptors to show role for glutamate in the development of drug-induced behaviors (Karler et al., 1989), and lesion studies confirmed this contribution came from the glutamate circuitry coming from hippocampus, the PFC, and amygdala onto the NAc (for review, Wolf, 1998). In MSNs, ionotropic and metabotropic glutamate receptors are expressed in close proximity to the DA GPCR (Hara and Pickel, 2005). This morphological co-localization of DA and glutamate receptors provides a number of possibilities for interactions, including signaling crosstalk and direct interaction in protein complexes.

Metabotropic glutamate receptors

Glutamate, like DA, can also activate GPCRs. Eight mGluRs are classified into three groups based on sequence homology and G protein interactions: group I (mGluR1, mGluR5), group II (mGluR2, mGluR3), and group III (mGluR4, mGluR6, mGluR7, and mGluR8; Ferraguti and Shigemoto, 2006).

mGluR1 and mGluR5, which are Gq protein-coupled, are mostly located postsynaptically (Mitrano and Smith, 2007). Their activation induces mobilization of intracellular Ca^{2+} stores and activation of phospholipase C (Schoepp and Conn, 1993). mGluR5 KO animals do not self-administer cocaine and do not display locomotor sensitization (Chiamulera et al., 2001). Systemic administration of the mGluR5 receptor antagonist, MPEP, decreased cocaine self-administration (Kenny et al., 2003, 2005; Lee et al., 2005; Platt et al., 2008) and attenuated the ability of a priming injection of cocaine (Lee et al., 2005) or cocaine-associated cues (Bäckström and Hyttiä, 2007) to reinstate cocaine seeking. Administration of MPEP into the NAcc shell attenuated cocaine priming-induced reinstatement of drug seeking, an animal model of relapse (Kumaresan et al., 2009). Altogether these data clearly indicated that activation of mGluR5, specifically in the NAcc, may promote the reinstatement of drug seeking.

The activation of the presynaptic Group II mGluRs inhibits cAMP and PKA signaling as they are coupled to Gi/o proteins. The reduction in extrasynaptic glutamate availability after chronic cocaine treatment and withdrawal, due to disruption of the cysteine-glutamate exchanger, removes the tonic activation of group 2 mGluR that would normally inhibit glutamate release. This can explain why during reinstatement, the challenge, or renewed drug experience or cue evokes a potentiated glutamate response, which is not seen with an acute injection of cocaine (Pierce et al., 1996).

The group 3 mGluR contain mGluR4, mGluR6, mGluR7, and mGluR8 and similarly to Group 2 they are negatively coupled to adenylyl cyclase activity and found presynaptically in the glutamatergic terminals of the striatum. When an agonist (L-AP4) of the group 3 mGluR was administered into the striatum of cocaine-naïve mice there was no effect on locomotor activity, however, in mice subsequently treated with cocaine the compound was able to prevent the induction of locomotor sensitization (Mao and Wang, 2000).

Focus on NMDAR: regulation by drugs of abuse

The ionotropic glutamate receptors are classed based on their affinity for synthetic agonists: N-methyl-D-aspartate (NMDA), α -amino-3-hydroxy-5-methy-4-isoxazole propionate (AMPA), and kainate. These are ligand gated ion channels, composed of heteromeric complexes of four integral membrane protein subunits and have long intracellular cytoplasmic tails. Unlike the AMPAR or kainate receptors, the NMDAR channel is blocked by the presence of a magnesium ion in a voltage-dependent manner. In this way they respond to the binding of glutamate only when accompanied by a depolarization of the post synaptic membrane (Mayer et al., 1984). Furthermore their activation requires the binding of a co-agonist (Kleckner and Dingledine, 1988). The NMDAR are permeable to monovalent cations and calcium, and so provide a major entry point for triggering Ca^{2+} dependent intracellular

pathways. The NMDAR subunits are grouped into classes: GluN1, GluN2A-D, and GluN3A-B (formally denoted NR1, etc.). The different subunits contain different agonist binding sites, which infer them each with a specific pharmacology. The GluN1 or GluN3 are obligatory to form the ion channel and contain the binding site for the co-agonists glycine (Kleckner and Dingledine, 1988) or D-serine (Mothet et al., 2000) and it is the GluN2 subunits that contain the site for glutamate (Laube et al., 1997).

Context-dependent sensitization induced by single exposure to cocaine is completely prevented in mice pre-treated with the selective NMDAR antagonist, MK801, in a two-injection protocol (Valjent et al., 2010), as well as in the repeated injection protocol (Schenk et al., 1993). Similarly, GluN1-knockdown mice showed an attenuation of sensitization induced by cocaine (Ramsey et al., 2008). The precise location at which NMDA receptors are critical appears not to be limited to DA neurons themselves. Mice with specific inactivation of GluN1 in DA neurons did not show alteration of short-term sensitization, but a decreased long-term sensitization (Engblom et al., 2008; Zweifel et al., 2008). In contrast, expression of mutant NMDARs in D1R-containing MSNs prevented cocaine sensitization (Heusner and Palmiter, 2005). Altogether, these observations support the hypothesis that NMDARs located in MSNs, in the striatum, and/or on their terminals in the VTA, as indicated by the effects of local infusion of antagonists (Vezina and Queen, 2000), contribute to the development of sensitization.

One day after acute cocaine treatment the total expression levels of the NMDAR subunits do not change in the NAcc, however, their subcellular localization is altered, with an increased internalization (Schumann and Yaka, 2009). After a 3-weeks withdrawal from repeated cocaine exposure, global expression levels and surface expression of the NMDAR subunits are increased, specifically in the NAcc. This indicates that during withdrawal some long-term processes are occurring to heighten the glutamatergic receptor levels in the NAcc.

SIGNALING CROSSTALK BETWEEN D1R AND GLUTAMATE RECEPTORS

D1R-MEDIATED PKA REGULATION AND ITS INFLUENCE ON GLUTAMATE RECEPTORS

An acute injection of cocaine does not increase the levels of D1R protein in the dorsal striatum but trigger intracellular signaling cascades that are capable of modulating cell excitability via interactions with ion channels, including the glutamatergic AMPAR and NMDAR. In the striatum, as the D1-like family of DA receptors are coupled to stimulatory $G_{\alpha\text{olf}}$ G-proteins (see Hervé, 2011, for review), the most widely studied consequence of G-protein activation downstream of DA receptors is their influence on PKA-regulated signaling.

After the binding of DA to D1R a change in G-protein association enables the activation of the Ca^{2+} -insensitive adenylyl cyclase 5 (AC5) isoform. The major target of cAMP is the cAMP-dependent PKA that has many targets including the glutamate receptor subunits. The duration of PKA activation is determined by feedback loops due to the activation of phosphodiesterases (PDEs) that are expressed in the striatum and limit cAMP production (Menniti et al., 2006).

Protein kinase A rapidly phosphorylates the NMDAR (Leonard and Hell, 1997) in response to DA, even after just 30 s in presence of a DAT inhibitor (Snyder et al., 1998). This phosphorylation occurs at Ser⁸⁹⁷ of the GluN1 subunit (Tingley et al., 1997). Phosphorylation of NMDAR subunits is a well-characterized mechanism to control their trafficking to the membrane (Scott et al., 2001; Lau and Zukin, 2007). Ion channels are also targeted by PKA and their phosphorylation can alter the conductance state of the cell. PKA mediated phosphorylation of sodium channels leads to hyperpolarization of MSNs (Schiffmann et al., 1995), and can indirectly diminish N and P/Q-type channel calcium currents that are largely localized to dendrites. On the other hand, L-type currents, at the soma, are potentiated by a PKA mechanism that boosts cellular conductance (Surmeier et al., 1995). Antagonists of the L-type Ca^{2+} channels can prevent the reinstatement of cocaine seeking, this was linked to the activation of Ca^{2+} /CaM-dependent kinase CaMKII and regulation of AMPAR trafficking (Anderson et al., 2008).

PKA REGULATION OF DARPP-32 AND INFLUENCE ON GLUTAMATE RECEPTORS

A number of the intermediates between PKA and its transmembrane protein targets are kinases and/or phosphatases particularly enriched in the striatum. In the late 80s, the Greengard group characterized many of these, including ARPP-16 (cAMP-regulated phosphoprotein of Mr 16), ARPP-19, ARPP-21 (regulator of calmodulin signaling), ARPP-39, and ARPP-90 (Rap1Gap, Walaas et al., 1989; Girault et al., 1990; Walaas and Greengard, 1993). ARPP-16 and ARPP-19 phosphorylation was confirmed to be strictly dependent on the D1R (Dulubova et al., 2001). DA and cAMP regulated phosphoprotein of Mr 32kDa (DARPP-32) was identified before many of the ARPPs and has received more attention in the context of drugs of abuse as the expression of DARPP-32 is most evident in neurons of the ventral and dorsal striatum (Walaas et al., 1983).

In the context of addiction, the knockout mice for DARPP-32 had diminished hyper-locomotor responses at low doses of acute cocaine (Fienberg et al., 1998; Hiroi et al., 1999). Locomotor sensitization to cocaine was absent in the DARPP-32 knockout when a two injection protocol of sensitization (TIPS) was used (Valjent et al., 2005) but not after repeated injections (Hiroi et al., 1999). PKA phosphorylates the Thr³⁴ residue of DARPP-32 that permits it to act as an inhibitor of protein phosphatase I (PP1, Hemmings et al., 1984). By this means, DARPP-32 supports PKA driven activity, in particular certain substrates such as the phosphorylation of GluR1 at Ser⁸⁴⁵ and GluN1 at Ser⁸⁹⁷. Additional phosphorylation sites regulate DARPP-32 activity including Thr⁷⁵ by Cdk5, Ser⁹⁷ by CK2, and Ser¹³⁰ by CK1 (see Walaas et al., 2011, for review). The Thr⁷⁵ phosphorylation allows DARPP-32 to regulate its own activity by inhibiting PKA and, in basal conditions this site is phosphorylated. The Ser⁹⁷ site is located near a nuclear export signal and aids DARPP-32 to remain outside the nucleus when phosphorylated (Stipanovich et al., 2008). The Ser¹³⁰ residue also allows DARPP-32 to regulate its own activity because it inhibits the dephosphorylation of the Thr⁷⁵ site by protein phosphatase 2B (PP2B). The gene encoding DARPP-32, *ppp1r1b*, is subject to polymorphisms in humans that gives rise to a truncated form

(t-DARPP-32), which lacks the Thr⁷⁵ site and is associated with schizophrenic and bipolar phenotypes (Kunii et al., 2013). These sites are equally subject to dephosphorylation. Thr³⁴ is dephosphorylated by the CaN and thereby allows the activity of PP1 (Nishi et al., 1999). On the other hand, dephosphorylation of Thr⁷⁵ by PP2A, favors the phosphorylation of Thr³⁴ and PP1 inhibition. PP2A also dephosphorylates the Ser⁹⁷ residue. In the striatum, PP2A is activated after cAMP-induced phosphorylation of its B56 δ subunit.

One extensive study systematically assessed the role of the different residues in DARPP-32 by performing point mutations that replaced the sites that would be normally be phosphorylated by an alanine (Stipanovich et al., 2008). A notable effect was that the Ser⁹⁷ site in itself controls the subcellular localization of DARPP-32. When Ser⁹⁷ was mutated to alanine, DARPP-32 was unable to be exported from the nucleus to the cytoplasm and the opposite was observed if a phosphorylation-mimicking mutation, to aspartate, was made. Both these effects were preserved even after activation of the D1R by SKF81297. To investigate the Ser⁹⁷ mutation to alanine *in vivo*, mutant mice were also generated and analyzed for alterations in cocaine-induced behaviors (Stipanovich et al., 2008). Firstly, the Ser⁹⁷Ala-DARPP32 mice had normal acute locomotor responses to cocaine but a reduced locomotor sensitization to a second cocaine injection. Secondly, cocaine-induced CPP was not observed in these mice. Finally, this mouse line had a lower breaking point in a food self-administration test. These findings suggested that the nuclear shuttling of DARPP-32 is particularly important for the learned associative behaviors for reward seeking. The contribution of DARPP-32 in locomotor behaviors was further investigated in conditional knockout mice for DARPP-32 expression in either the D1R-expressing or D2R-expressing MSNs (Bateup et al., 2010). The loss of DARPP-32 in either population prevented the induction of long term potentiation (LTP). The conditional knockout in D1R MSNs had a diminished basal locomotor activity as measured by the distance traveled in an open field maze, while a disinhibition of activity was seen in the D2R conditional knockout. The lack of effect on basal locomotion in the full knockout may be interpreted as the net result of this D1R-MSN hypo-locomotor activity plus the D2R-MSN driven hyperactivity.

D1R MODULATION OF NMDAR SIGNALING VIA SFK

When Wittman and colleagues investigated the potentiation of NMDAR responses by clozapine (a last-resort medication for schizophrenia which has multiple actions including on the DA and Glu limbic system), they found that PKA inhibitors prevented the D1R enhancement of NMDAR transmission. Similar results were also found in presence of “PP2,” an inhibitor of the Src family kinases (SFKs). They went on to show that the D1R stimulation potentiated calcium influx via NMDAR containing the GluN2B subunit (Wittmann et al., 2005). The SFK members expressed in the CNS are Src itself, Fyn, Lyn, Lck, and Yes. Src and Fyn are the most homologous in sequence and are both found in the PSD, where they potentiate NMDAR currents (Köhr and Seeburg, 1996).

Using subcellular fractionation, Dunah and Standaert (2001) observed that the GluN2B and GluN2A contents of synaptosomal

striatal membranes were increased after stimulation of the D1R and this was dependent on the action of protein tyrosine kinases. GluN2B can be phosphorylated by SFK/Fyn *in vivo* (Nakazawa et al., 2001), and D1R-induced enhancement in the synaptic content of NMDAR subunits is absent in Fyn knockout mice (Dunah et al., 2004). Yaka et al. (2002) noticed sequence homology between certain regions in Fyn and GluN2B-ct and described a binding interaction between these two sites with the scaffold protein RACK1 that limits the ability of Fyn to phosphorylate GluN2B. In a follow up study, the authors further characterized the implicated pathways and found that, in the hippocampus, activation of the pituitary adenylate cyclase activating peptide (PACAP) receptors stimulated Gs signaling that releases RACK1 from GluN2B and Fyn and increased NMDAR activity. This was associated with PACAP-induced translocation of RACK1 to the nucleus where it induced brain derived neurotrophic factor (BDNF) expression (Yaka et al., 2003). An interaction also exists between Fyn and PSD-95, since the Src homology 2 (SH2) domain of Fyn binds to the third PDZ domain of PSD-95 (Tezuka et al., 1999). PSD-95 associates with the last four amino acids of the GluN2B subunit, which are in close proximity to the Tyr¹⁴⁷² residues targeted by Fyn. In this way, PSD-95 may bring Fyn nearer to the GluN2B subunit for its phosphorylation and also regulate GluN2B trafficking. D1R stimulation results in an increase in Fyn colocalization with GluN2B, which is Fyn (and not Src) dependent in the PFC (Hu et al., 2010).

Importantly, it was recently shown that D1R and NMDAR co-stimulation, as well as cocaine *in vivo*, activated Fyn and phosphorylated GluN2B at the Tyr¹⁴⁷² residue. The activation of Fyn was G-protein dependent, but independent of cAMP production (Pascoli et al., 2011a). The exact mechanisms governing the activation of Fyn in the striatum are, however, not fully understood. The SFK are found in an inactive state when they are phosphorylated on Tyr⁵²⁵ (for mouse Fyn). The dephosphorylation of this site and autophosphorylation at Tyr⁴²⁰ leads to a conformational change that opens the activation loop. The inactive conformation involves a binding interaction between the Fyn SH2 and SH3 domains (for review see Salter and Kalia, 2004). Therefore, the above-mentioned interaction of PSD-95 with the SH2 domain of Fyn may favor Fyn activation, but whether it may be a cause or consequence is unclear.

As for the deactivation of Fyn an interesting candidate is striatal enriched protein tyrosine phosphatase (STEP). STEP dephosphorylates GluN2B at Tyr¹⁴⁷² (Snyder et al., 2005). STEP exists in two major catalytic isoforms STEP46 and STEP61, which have distinct N-terminus regions, and each isoform has a specific intracellular location. STEP46 is localized in the cytosolic compartment, while STEP61 is attached to membranes of the ER or PSD. To interact with its substrates, STEPs must bind them using a kinase interacting motif (KIM) domain. The KIM of STEP is phosphorylated by PKA after D1R activation, at Ser160 and Ser221 in STEP61 and Ser49 for STEP46 (Paul et al., 2000). This phosphorylation event prevents STEP binding to its substrates. The Ser160 site is suspected to have a role in the regulation of a proteolytic cleavage sequence (known as PEST sequences) in STEP, whereas Ser221 and Ser46 may lose affinity for their substrates after phosphorylation. STEP61 KIM binds to the SH2 and N-terminus domain

of Fyn, and dephosphorylates the Tyr⁴²⁰ regulatory site but not the Tyr⁵³¹ sites (Nguyen et al., 2002). STEP also dephosphorylates the mitogen activated protein kinase (MAPK) extracellular-signal regulated kinase (ERK; Pulido et al., 1998).

EXTRACELLULAR SIGNAL-REGULATED KINASE PATHWAY

A major consequence of drugs of abuse administration is activation of the MAP kinase/ERK (extracellular-signal regulated kinase) pathway. ERK1 and ERK2 are two closely related mitogen-activated protein kinases (MAP-kinases), which are activated by phosphorylation of their activation loop by MAP-kinase and ERK-kinase (MEK 1 and 2). Valjent et al. (2000) demonstrated that acute cocaine elicits a rapid and transient increase in ERK1/2 phosphorylation within the ventral and dorsal striatum that remained after chronic administration. They further demonstrated that ERK1/2 activation was a common feature of most drugs of abuse (Valjent et al., 2001, 2004). Even if slight differences could be observed in the kinetic patterns of activation, nicotine, morphine, Δ^9 -tetrahydrocannabinol (THC) and psychostimulants, increased ERK1/2 phosphorylation occurred in the reward circuitry, including the prefrontal cortex, the striatum (dorsal part and NAc) as well as the extended amygdala. In all cases, and all structures drug-induced ERK activation was blocked by the D1R antagonist, SCH23390 (Valjent et al., 2004). 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA, also known as ecstasy), and ethanol also activate ERK1/2 in the striatum (Salzmann et al., 2003; Ibba et al., 2009). ERK1/2 activation induced by drugs of abuse is functionally relevant since SL327, a pharmacological compound that act on MEK and crosses the blood-brain barrier, prevented the long-term behavioral effects of cocaine, such as CPP; Valjent et al., 2000, or the development of locomotor sensitization (Valjent et al., 2006a). A different MEK inhibitor, PD98059, injected into the NAcc either before or after CPP training sessions blocks subsequent amphetamine CPP expression (Gerdjikov et al., 2004). ERK activation is also involved in the reconsolidation of drug-associated memories since it was reactivated by exposure to the drug-associated context and because MEK inhibition was able to erase previously acquired CPP (Miller and Marshall, 2005; Valjent et al., 2006b).

Striatal ERK2 activation involves both D1Rs and NMDA glutamate receptors, since it is prevented by either a D1R antagonist or in D1R knock-out mice, or by an NMDA antagonist (Valjent et al., 2000, 2005). It is only observed in a subset of D1R-expressing striatonigral neurons (Bertran-Gonzalez et al., 2008). Therefore, the modality of ERK1/2 activation in MSNs has been proposed to reflect the convergence of DA and glutamate signaling onto MSNs, thereby placing ERK1/2 as a coincidence detector, which detects the simultaneous arrival of contextual information coded by corticostriatal and thalamostriatal glutamate inputs, and the reward prediction error coded by DA neurons (Girault et al., 2007).

Whether ERK1 or ERK2 is fully responsible for the molecular responses to cocaine remains to be established. Ablation of ERK1 in cultured cells resulted in a stimulus-dependent increase of ERK2 signaling (Mazzucchelli et al., 2002), without altering the basal levels of ERK2 expression. This apparent competition of ERK1 with ERK2 signaling, that is removed in the knock-out mice,

lends the interpretation of the independent role of each isoform complex. However, the generation of ERK1 mutant mice revealed that removal of ERK1 results in an hypersensitivity to the rewarding properties of morphine and the rewarding and psychomotor effects of cocaine (Mazzucchelli et al., 2002; Ferguson et al., 2006). Furthermore, increased synaptic plasticity LTP was observed in the NAcc, hippocampus, and lateral amygdala slices from ERK1 KO mice, an effect that was specifically reversed by U0126, a selective MEK inhibitor (Mazzucchelli et al., 2002). These findings strongly support that ERK2 is the dominant isoform for neuronal plasticity and behavioral adaptations induced by addictive drugs.

Upstream from MEK, ERK activation induced by cocaine involves the calcium-activated guanine nucleotide exchange factor Ras-GRF1 (Fasano et al., 2009; Fasano and Brambilla, 2011). Knock-out mice for Ras-GRF1 show a significant reduction, but not total inhibition, of cocaine-induced ERK activation, and locomotor sensitization. On the other hand, mice that over-expressed Ras-GRF1 were more sensitive to cocaine treatment than wildtype counterparts (Fasano et al., 2009; Fasano and Brambilla, 2011; Cerovic et al., 2013). Interestingly, Ras-GRF1 is preferentially associated with GluN2B subunits (Krapivinsky et al., 2003). The cross talk between D1R and NMDA receptors implicates a cAMP-independent pathway that increases responsiveness of GluN2B containing NMDA receptors to glutamate (Pascoli et al., 2011a). In striatal neurons, D1R stimulation leads to an increase in Ca²⁺ influx through NMDARs via SFK/Fyn-induced phosphorylation of the GluN2B subunit at Tyr¹⁴⁷². In parallel, PKA-mediated phosphorylation of DARPP-32 promotes ERK activation through an indirect inhibition of STEP. DARPP-32 thus prevents ERK dephosphorylation and contributes to enhanced glutamate mediated-ERK activation (see **Figure 1**; Valjent et al., 2005).

As stated above, mGluR5 receptors seem to be critically involved in cocaine-induced long term behavioral alterations. A link between amphetamine-induced ERK phosphorylation and mGluR5 was found when using a mGluR5 antagonist, MPEP, which blocked amphetamine induction of ERK in the dorsal striatum (Choe et al., 2002). Surprisingly, this inhibition was not due to mobilization of intracellular Ca²⁺ stores since dantrolene – a compound that blocks intracellular Ca²⁺ release from ryanodine-sensitive stores – did not affect amphetamine effects. The Group I mGluR can modulate NMDAR signaling onto ERK activation via PKC (Niswender and Conn, 2010) and also via direct physical interactions (Perroy et al., 2008).

An elegant work from Pascoli et al. (2011b) recently showed that ERK activation was necessary for corticostriatal LTP induced by electrical stimulation in slices of mice treated with cocaine administration *in vivo*, and that this synaptic plasticity was necessary for locomotor sensitization (Pascoli et al., 2011b). Furthermore, it is now well established that this long-term behavioral adaptation to cocaine relies on gene regulation and new protein synthesis (Valjent et al., 2006a).

Under basal conditions, the unphosphorylated form of ERK1/2 is detected in the cytoplasm of neurons. Upon cocaine administration, the active di-phosphorylated ERKs translocate to the nucleus where they control both epigenetic

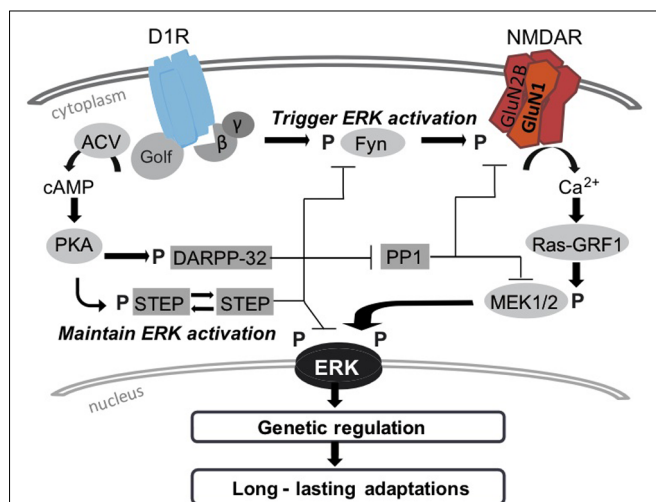


FIGURE 1 | Cocaine, similarly to most drugs of abuse, produces long lasting brain changes, that rely on gene expression and new protein synthesis. These long-term neuronal adaptations take place in majority in DA-D1R expressing MSNs that belong to the direct pathway. The ERK pathway is central in this striatal plasticity, and detects a combination of glutamate and DA signals that are essential for long lasting modifications. Cocaine-induced ERK activation depends on complex cascade of phosphorylation events downstream D1-R. Importantly, the triggering event in ERK activation depends on a non-canonical signaling pathway that associates Fyn-induced phosphorylation of GluN2B and increases in calcium influx into D1-R MSNs. The duration and maintenance of ERK activation occurs via cAMP/PKA pathway. The cAMP/PKA pathway, downstream D1 receptors (left panel) triggers deactivation of phosphatases, PP1 on one hand by DARPP-32, and STEP on the other hand (Valjent et al., 2005). By controlling the activity of the tyrosine kinase Fyn and the dual specificity protein kinase MEK, this signaling cascade intervenes in the state of phosphorylation of ERK downstream DA-D1R stimulation. However, we propose that triggering ERK activation depends on a “non-canonical signaling” pathway downstream D1-R (right panel). A cAMP-independent activation of Fyn produces tyrosine phosphorylation of GluN2B subunit of NMDA-Rs that in turn facilitates calcium influx (Pascoli et al., 2011a), and activation of the calcium-sensitive Ras-guanine releasing factor (Ras-GRF1) that activates the MEK/ERK pathway (Fasano and Brambilla, 2011). Upon cocaine stimulation ERK translocates to the nucleus where it controls epigenetic and genetic programs. Among the latter, the transcription factor Elk-1 is a component of the ternary complex factor, which binds to SRE (Besnard et al., 2011a). ERK1/2 also phosphorylates the nuclear kinase MSK1 which appears to play a prominent role in phosphorylation of histone H3 and cAMP-response element-binding (CREB) protein (Brami-Cherrier et al., 2005). This leads to the expression of immediate-early genes, which are particularly sensitive to CREB (e.g., cFos) or ternary complex factor (e.g., Zif268 a.k.a. Egr-1). These two nuclear pathways downstream from ERK have distinct roles in long-term behavioral adaptations (see text). DA-GPCR and NMDAR, in particular D1R and GluN1, oligomerization has been documented in heterologous systems, hippocampal, and striatal tissues after cocaine exposure. The role of D1R-GluN1 interaction in ERK activation and downstream molecular events remains to be established.

and genetic responses. This cyto-nuclear shuttling of ERK involves clathrin-dependent endocytosis originating from glutamate AMPA receptors (AMPA) endocytosis (Trifilieff et al., 2009). Within the nucleus ERK2 can phosphorylate several nuclear kinases, including p90 ribosomal protein S6 kinases (RSK1/2) and the mitogen and stress-activated protein kinases MSK1 and 2. MSK1, but not RSK1/2 nor MSK2, is rapidly phosphorylated downstream of ERK in MSN in response to cocaine

(Brami-Cherrier et al., 2005). In turn, activated MSK1 targets both the cAMP-responsive element-binding (CREB) transcription factor and histone H3 and *msk1* knockout mice show a decreased phosphorylation of Ser¹³³-CREB and Ser¹⁰-histone H3 induced by cocaine (Brami-Cherrier et al., 2005). This effect on Ser¹³³-CREB phosphorylation was particularly remarkable as this residue is a common substrate for various kinases, including RSK1/2, CaMKIV, and PKA, with PKA being traditionally considered as the major CREB kinase in the striatum (Nestler, 2004). For transcription to occur, DNA decompaction is required to allow the action of the core transcription machinery and transcription factors. Such remodeling of DNA depends on post-translational modifications of histones, including Ser¹⁰-histone H3 phosphorylation that positively regulates gene expression (Brami-Cherrier et al., 2009). The default of cocaine-induced Ser¹⁰-histone H3 phosphorylation observed in *msk1* deficient mice was associated with a striking impact on the induction of immediate early genes, such as c-Fos and dynorphin, which were blocked, whereas the induction of Egr-1/Zif268 was spared (Brami-Cherrier et al., 2005). Remarkably, *msk1* null mice displayed a decreased psychomotor sensitization to cocaine, whereas CPP was slightly enhanced, in agreement with the role of CREB and dynorphin in the aversive effects of drugs (Carlezon et al., 1998). MSK1-independent genes, such as *zif268*, thus seem to be more related to the rewarding properties of cocaine, as supported by the lack of cocaine-induced CPP encountered in *zif268* knockout mice (Valjent et al., 2006b). Although the role of kinases in histone H3 phosphorylation has been extensively investigated, phosphatases are also implicated in this process. Inhibition of PP1, the phosphatase for Ser¹⁰-histone H3, is induced by cocaine via phosphorylation and nuclear translocation of DARPP-32 and is involved in H3 phosphorylation in response to cocaine (Stipanovich et al., 2008).

Ternary complex factors (TCFs) are direct ERK targets that control serum responsive element (SRE)-driven transcription. Among TCFs, Elk1 is phosphorylated by ERK in MSN in response to acute cocaine or amphetamine (Valjent et al., 2000; Choe et al., 2002). The role of Elk1 in mediating cocaine responses was difficult to determine because of the redundancy within TCFs (Cesari et al., 2004) and because Elk-1 is found in dendrites and nuclei of neurons (Sgambato et al., 1998) where it governs opposite biological outcomes (Besnard et al., 2011b). In MSN, phosphorylation on Ser^{383/389}-Elk-1 by ERK triggers its translocation from the cytoplasm to the nucleus (Lavaur et al., 2007). The selective inhibition of Elk-1 phosphorylation, downstream ERK, using a cell penetrating peptide, the TAT-DEF-Elk-1 (TDE; Lavaur et al., 2007), significantly impaired cocaine-induced IEG expression (cFos, Zif268, and Arc) along with dendritic spine formation onto MSN (Besnard et al., 2011a). An unexpected effect of TDE was found on chromatin remodeling since histone H3 phosphorylation induced by cocaine was strongly impaired, despite maintained MSK-1 phosphorylation. These data indicate that Elk-1 phosphorylation in the nucleus orchestrates important molecular events, including the recruitment of MSK-1 to the DNA, close to histones. Importantly, TDE also interfered with locomotor sensitization and CPP (in a one but not three-pairing protocol).

OLIGOMER FORMATION: A POTENTIAL MECHANISM FOR D1R-MEDIATED REGULATION OF GLUTAMATE TRANSMISSION

Interactions between DA-GPCR and NMDAR have been documented. The subcellular co-localization of D1R and NMDAR has been characterized in the striatum by electron microscopy (Hara and Pickel, 2005). This physical proximity supported the idea that the two receptors interact extensively. Lee et al. (2002) demonstrated that D1R interact with the GluN1 and GluN2A subunits, using co-immunoprecipitation studies from rat hippocampal cultures and transfection of Cos-7 cell and HEK2397 lines (Pei et al., 2004). Three GST-peptides were constructed based on the sequence of the D1R c-terminal tail (D1-t sequences) and interactions were revealed between the D1-t2 sequence and the GluN1 subunit and D1-t3 sequence and the GluN2A subunit. Subsequent biochemical studies using synthesized peptides were able to determine, by mass spectrometry, that the interaction was likely due to electrostatic forces (Woods et al., 2005). The GluN1-C1 cassette contains the Arg-rich epitope and the D1R contains a corresponding acidic epitope. Mass spectrometry showed that these two regions interacted and interestingly, they found that Ser397 in the Dt2 acidic epitope could possibly be phosphorylated by CKI and a phosphorylated version of the peptide bound five times more to the GluN1 Arg rich epitope. It remains to be shown in more native receptor environments if indeed this residue favors the association. The stability of the D1-t2/GluN1 interaction after exposure to ligand remains unclear. In hippocampal neurons and in Cos-7 cells co-transfected with D1R and GluN1, Lee et al. (2002) saw a significant decrease in the co-immunoprecipitation of D1R or Glu1 after treatment with SKF-81297. However, no such changes were seen for the D1/GluN2A interaction.

The D1R/GluN1 interaction was also found in PSD enriched fractions of striatal tissue (Fiorentini et al., 2003). The authors showed that co-expression of the D1R/GluN1/GluN2B subunits allowed their trafficking to the membrane. It had previously been established that GluN1 alone is restricted to the ER and when GluN1 was co-transfected with D1R, the D1R signal also became restraint to the cytosol and ER. It is thought that oligomerization may hide ER retention signals allowing the passage of the receptor to the export machinery. Despite DA not affecting the BRET signal for association, it was shown that SKF-81297 treatment prevented the internalization of D1R but only when co-expressed with GluN1/GluN2B. This may suggest that once at the membrane in a formed complex, stimulation of the D1R stabilized its presence or association. The association of D1R with NMDAR not only alters their trafficking from the ER to the plasma membrane but also along its surface. Scott and colleagues were able to observe that after just 3 mins from exposure to NMDA, MSN spines contained more D1R (Scott et al., 2006). To explain how D1R signal in spines was increased by NMDA, the authors proposed that the direct interaction with NMDAR would “trap” the D1R to the synapse. They performed site-directed mutagenesis experiments and found that if Ser³⁹⁷ or Ser³⁹⁸ in the Dt2 domain were mutated to alanine the NMDA effect was lost and the D1R no longer bound GluN1 GST-peptides. The authors were unable to confirm a kinase for these sites, yet their findings established a model, the “diffusion trap,” whereby NMDAR activation would cause some change in

the receptor to enhance the binding with D1R and “trap” them to the spine. The ultimate result of the above mentioned diffusion trap would be to potentiate mutually the receptors.

The D1R/GluN1 oligomer has been demonstrated to have consequences on cellular plasticity and behavior in the hippocampus (Nai et al., 2010). The authors described that the D1R mediated enhancement of plasticity was via direct interactions with GluN1 that was also necessary for spatial working memory. Studies have also addressed whether these D1R/NMDAR oligomers may be implicated in pathologies. DA and glutamate transmission are frequently considered in studies of PD, and Fiorentini et al. (2006) found a significant decrease in the D1R/NMDAR interaction in both the 6-OHDA lesioned mice and in the L-DOPA induced dyskinetic (LID) mice relative to controls.

As with regards to drugs of abuse, one study did examine the D1R/GluN1 interaction after exposure to cocaine (Sun et al., 2009). By Western-blotting, the authors did not detect any change in total expression of the D1R or GluN1 in the dorsal striatum over a 60-min period following an acute (30 mg/kg) injection of cocaine. The authors reported that at 30 min post-acute cocaine there was a significant decrease in the GluN1 immunoprecipitated by the D1R antibody. The authors speculated that as the time point where they saw their effect corresponds to the point at which ERK activity returns to basal activity, the two may be linked and that the disruption of the D1R/GluN1 interaction may limit ERK activity. These possibilities were not tested and so remain to be investigated. A D2R/GluN2B oligomer was also found to be regulated by cocaine (Liu et al., 2006). In the striatum the association between the third intracellular loop of the D2R and the carboxyl terminal tail of GluN2B was enhanced by cocaine. The binding of D2R to the GluN2B displaces CaMKII and reduced GluN2B phosphorylation at Ser¹³⁰³ and calcium currents. Furthermore this interaction was shown to have functional consequences as a TAT-coupled peptide that mimicked the D2R region of interaction prevented acute horizontal activity and stereotyped behavior normally induced by cocaine. These studies suggest that direct interactions between DA GPCR and NMDAR will provide another level for interaction, and perhaps possible interventions, with regards to addictive-drug induced signaling.

CONCLUSION PERSPECTIVES

Despite the usefulness of animal models for studies of addiction treatment the majority of therapeutic strategies for cocaine addiction still consist mostly of psychiatric therapy. For psychostimulants in general, there is a marked absence of effective treatments despite considerable neurobiological knowledge. Unlike some other “addictions” substitution regimes do not exist for cocaine. Most strategies are based on targeting the neurotransmitter receptors implicated in the reward circuitry. Dissimilar to alcohol or opiates, the withdrawal syndrome from cocaine is not as severe and thus, therapies can focus more on preventing relapse and craving rather than treating withdrawal symptoms.

As DA plays a critical role in motivation, reward, and locomotion, studies have focused on modifying its functions in addicted humans. To counter the DA increase elicited by cocaine, a DA depletor reserpine was tested in humans but found to be ineffective (Winhusen et al., 2007). A D1R antagonist Ecopipam was tested

in humans who were addicted to crack cocaine, and was found to reduce self-assessed measures of acute cocaine effects such as the “high” (Romach et al., 1999). However, with chronic administration Ecopipam unfortunately failed as it actually increased the reported “high” of the drug and increased self-administration (Haney et al., 2001). An explication for these findings is that the levels of expression and D1R sensitivity may be upregulated after chronic antagonism. Targeting solely DA transmission therefore has many caveats, in addition agonists or indeed antagonists may have non-specific effects on other DA regulated functions such as body temperature or cardiovascular function and the antagonists may alter mood and lead to non-compliance.

The glutamatergic system is also implicated in cocaine addiction and therapeutic studies have turned to drugs, which should balance glutamate transmission. Unfortunately few studies have shown any promise in humans. The non-competitive glutamate receptor antagonists Amantadine and Memantine (acting on the NMDAR) did not aid addicts to abstain from cocaine (Kampman et al., 2006; Collins et al., 2007). Although promising in rodent cocaine studies and successful for human alcohol dependence, the drug Acamprosate (NMDA type Glu receptor antagonist and GABA_A receptor agonist), proved ineffective for human cocaine addicts (Kampman et al., 2011). Some success was had with *N*-acetylcysteine, which promotes the replacement of intracellular glutamate for cysteine via anti-porters and so reduced glutamate transmission. In a pilot study, it was found to diminish the taking of cocaine by the majority of patients after treatment in the study (Mardikian et al., 2007). This may encourage future studies aiming to tone down Glu transmission in cocaine addiction.

Furthermore, in the early 1990s, a cocaine vaccine was developed. It was believed that the production of antibodies against the cocaine molecules could block its effects and thus help maintain abstinence. Unfortunately, getting patients to produce efficient levels of antibodies proved to be a great limit to this approach. A vaccine is currently under phase II multi-site clinical trials, but some reservations have been voiced regarding ethics of vaccines against addiction being used as a prevention or as a treatment (Young et al., 2012).

In summary, a considerable number of human and pre-clinical animal studies focus on restoring perturbations in the balance of DA and Glu transmission as a therapy for cocaine addiction, but from animal studies we now know that ERK signaling is a key coordinator in this system. We propose that D1R/GluN1 oligomers could participate also in this synergy. While blocking ERK activation by drugs is validated in animal models, its potential for human treatment is limited as it is a kinase implicated in a wide range of cellular processes. Instead, we content that targeting ERK signaling and its downstream partners (MSK-1 and histone phosphorylation, Elk-1 phosphorylation) within D1R-MSN specifically is a promising strategy. This strategy could include the signaling events that are at the crossroad of D1R and NMDAR synergism in response to cocaine (see **Figure 1**).

REFERENCES

- Anderson, S. M., Famous, K. R., Sadri-Vakili, G., Kumaresan, V., Schmidt, H. D., Bass, C. E., et al. (2008). CaMKII: a biochemical bridge linking accumbens dopamine and glutamate systems in cocaine seeking. *Nat. Neurosci.* 11, 344–353. doi: 10.1038/nn2054
- Ariano, M. A., Wang, J., Noblett, K. L., Larson, E. R., and Sibley, D. R. (1997). Cellular distribution of the rat D4 dopamine receptor protein in the CNS using anti-receptor antisera. *Brain Res.* 752, 26–34. doi: 10.1016/S0006-8993(96)01422-9
- Bäckström, P., and Hyttä, P. (2007). Involvement of AMPA/kainate, NMDA, and mGlu5 receptors in the nucleus accumbens core in cue-induced reinstatement of cocaine seeking in rats. *Psychopharmacology* 192, 571–580. doi: 10.1007/s00213-007-0753-8
- Bateup, H. S., Santini, E., Shen, W., Birnbaum, S., Valjent, E., Surmeier, D. J., et al. (2010). Distinct subclasses of medium spiny neurons differentially regulate striatal motor behaviors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 107, 14845–14850. doi: 10.1073/pnas.1009874107
- Bertran-Gonzalez, J., Bosch, C., Maroteaux, M., Matamalas, M., Hervé, D., Valjent, E., et al. (2008). Opposing patterns of signaling activation in dopamine D1 and D2 receptor-expressing striatal neurons in response to cocaine and haloperidol. *J. Neurosci.* 28, 5671–5685. doi: 10.1523/JNEUROSCI.1039-08.2008
- Besnard, A., Bouveyron, N., Kappes, V., Pascoli, V., Pagès, C., Heck, N., et al. (2011a). Alterations of molecular and behavioral responses to cocaine by selective inhibition of Elk-1 phosphorylation. *J. Neurosci.* 31, 14296–14307. doi: 10.1523/JNEUROSCI.2890-11.2011
- Besnard, A., Galan-Rodriguez, B., Vanhoutte, P., and Caboche, J. (2011b). Elk-1 a transcription factor with multiple facets in the brain. *Front. Neurosci.* 5:35. doi: 10.3389/fnins.2011.00035
- Brami-Cherrier, K., Roze, E., Girault, J.-A., Betuing, S., and Caboche, J. (2009). Role of the ERK/MSK1 signalling pathway in chromatin remodelling and brain responses to drugs of abuse. *J. Neurochem.* 108, 1323–1335. doi: 10.1111/j.1471-4159.2009.05879.x
- Brami-Cherrier, K., Valjent, E., Hervé, D., Darragh, J., Corvol, J. C., Pages, C., et al. (2005). Parsing molecular and behavioral effects of cocaine in mitogen- and stress-activated protein kinase-1-deficient mice. *J. Neurosci.* 25, 11444–11454. doi: 10.1523/JNEUROSCI.1711-05.2005
- Caine, S. B., Thomsen, M., Gabriel, K. I., Berkowitz, J. S., Gold, L. H., Koob, G. F., et al. (2007). Lack of self-administration of cocaine in dopamine D1 receptor knock-out mice. *J. Neurosci.* 27, 13140–13150. doi: 10.1523/JNEUROSCI.2284-07.2007
- Carlezon, W. A., Thome, J., Olson, V. G., Lane-Ladd, S. B., Brodtkin, E. S., Hiroi, N., et al. (1998). Regulation of cocaine reward by CREB. *Science* 282, 2272–2275. doi: 10.1126/science.282.5397.2272
- Cerovic, M., d’Isa, R., Tonini, R., and Brambilla, R. (2013). Molecular and cellular mechanisms of dopamine-mediated plasticity in the striatum. *Neurobiol. Learn. Mem.* 105, 63–80. doi: 10.1016/j.nlm.2013.06.013
- Cesari, F., Brecht, S., Vintersten, K., Vuong, L. G., Hofmann, M., Klingel, K., et al. (2004). Mice deficient for the ets transcription factor elk-1 show normal immune responses and mildly impaired neuronal gene activation. *Mol. Cell. Biol.* 24, 294–305. doi: 10.1128/MCB.24.1.294-305.2004
- Chiamulera, C., Epping-Jordan, M. P., Zocchi, A., Marcon, C., Cottiny, C., Tacconi, S., et al. (2001). Reinforcing and locomotor stimulant effects of cocaine are absent in mGluR5 null mutant mice. *Nat. Neurosci.* 4, 873–874. doi: 10.1038/nn0901-873
- Choe, E. S., Chung, K. T., Mao, L., and Wang, J. Q. (2002). Amphetamine increases phosphorylation of extracellular signal-regulated kinase and transcription factors in the rat striatum via group I metabotropic glutamate receptors. *Neuropsychopharmacology* 27, 565–575. doi: 10.1016/S0893-133X(02)00341-X
- Collins, E. D., Vosberg, S. K., Ward, A. S., Haney, M., and Foltin, R. W. (2007). The effects of acute pretreatment with high-dose memantine on the cardiovascular and behavioral effects of cocaine in humans. *Exp. Clin. Psychopharmacol.* 15, 228–237. doi: 10.1037/1064-1297.15.3.228
- Cui, G., Jun, S. B., Jin, X., Pham, M. D., Vogel, S. S., Lovinger, D. M., et al. (2013). Concurrent activation of striatal direct and indirect pathways during action initiation. *Nature* 494, 238–242. doi: 10.1038/nature11846
- Di Chiara, G., and Imperato, A. (1988). Drugs abused by humans preferentially increase synaptic dopamine concentrations in the mesolimbic system of freely moving rats. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 85, 5274–5278. doi: 10.1073/pnas.85.14.5274
- Dulubova, I., Horiuchi, A., Snyder, G. L., Girault, J. A., Czernik, A. J., Shao, L., et al. (2001). ARPP-16/ARPP-19: a highly conserved family of cAMP-regulated

- phosphoproteins. *J. Neurochem.* 77, 229–238. doi: 10.1046/j.1471-4159.2001.t01-1-00191.x
- Dunah, A. W., Sirianni, A. C., Fienberg, A. A., Bastia, E., Schwarzschild, M. A., and Standaert, D. G. (2004). Dopamine D1-dependent trafficking of striatal N-methyl-D-aspartate glutamate receptors requires Fyn protein tyrosine kinase but not DARPP-32. *Mol. Pharmacol.* 65, 121–129. doi: 10.1124/mol.65.1.121
- Dunah, A. W., and Standaert, D. G. (2001). Dopamine D1 receptor-dependent trafficking of striatal NMDA glutamate receptors to the postsynaptic membrane. *J. Neurosci.* 21, 5546–5558.
- Engblom, D., Bilbao, A., Sanchis-Segura, C., Dahan, L., Perreau-Lenz, S., Balland, B., et al. (2008). Glutamate receptors on dopamine neurons control the persistence of cocaine seeking. *Neuron* 59, 497–508. doi: 10.1016/j.neuron.2008.07.010
- Everitt, B. J., and Robbins, T. W. (2005). Neural systems of reinforcement for drug addiction: from actions to habits to compulsion. *Nat. Neurosci.* 8, 1481–1489. doi: 10.1038/nn1579
- Fasano, S., and Brambilla, R. (2011). Ras-ERK signaling in behavior: old questions and new perspectives. *Front. Behav. Neurosci.* 5:79. doi: 10.3389/fnbeh.2011.00079
- Fasano, S., D'Antoni, A., Orban, P. C., Valjent, E., Putignano, E., Vara, H., et al. (2009). Ras-guanine nucleotide-releasing factor 1 (Ras-GRF1) controls activation of extracellular signal-regulated kinase (ERK) signaling in the striatum and long-term behavioral responses to cocaine. *Biol. Psychiatry* 66, 758–768. doi: 10.1016/j.biopsych.2009.03.014
- Ferguson, S. M., Fasano, S., Yang, P., Brambilla, R., and Robinson, T. E. (2006). Knockout of ERK1 enhances cocaine-evoked immediate early gene expression and behavioral plasticity. *Neuropsychopharmacology* 31, 2660–2668. doi: 10.1038/sj.npp.1301014
- Ferraguti, F., and Shigemoto, R. (2006). Metabotropic glutamate receptors. *Cell Tissue Res.* 326, 483–504. doi: 10.1007/s00441-006-0266-5
- Fienberg, A. A., Hiroi, N., Mermelstein, P. G., Song, W., Snyder, G. L., Nishi, A., et al. (1998). DARPP-32: regulator of the efficacy of dopaminergic neurotransmission. *Science* 281, 838–842. doi: 10.1126/science.281.5378.838
- Fiorentini, C., Gardoni, F., Spano, P., Di Luca, M., and Missale, C. (2003). Regulation of dopamine D1 receptor trafficking and desensitization by oligomerization with glutamate N-methyl-D-aspartate receptors. *J. Biol. Chem.* 278, 20196–20202. doi: 10.1074/jbc.M213140200
- Fiorentini, C., Rizzetti, M. C., Busi, C., Bontempi, S., Collo, G., Spano, P., et al. (2006). Loss of synaptic D1 dopamine/N-methyl-D-aspartate glutamate receptor complexes in L-DOPA-induced dyskinesia in the rat. *Mol. Pharmacol.* 69, 805–812. doi: 10.1124/mol.65.1.121
- Fontana, D., Post, R. M., Weiss, S. R. B., and Pert, A. (1993). The role of D1- and D2-dopamine receptors in the acquisition and expression of cocaine-induced conditioned increases in locomotor behavior. *Behav. Pharmacol.* 4, 375–387. doi: 10.1097/00008877-199308000-00011
- Gerdjikov, T. V., Ross, G. M., and Beninger, R. J. (2004). Place preference induced by nucleus accumbens amphetamine is impaired by antagonists of ERK of p38 MAP kinases in rat. *Behav. Neurosci.* 118, 7405–7750. doi: 10.1037/0735-7044.118.4.740
- Gerfen, C. R., Engber, T. M., Mahan, L. C., Susel, Z., Chase, T. N., Monsma, F. J., et al. (1990). D1 and D2 dopamine receptor-regulated gene expression of striatonigral and striatopallidal neurons. *Science* 250, 1429–1432. doi: 10.1126/science.2147780
- Girault, J. A., Horiuchi, A., Gustafson, E. L., Rosen, N., and Greengard, P. (1990). Differential expression of ARPP-16 and ARPP-19, two highly related cAMP-regulated phosphoproteins, one of which is specifically associated with dopamine-innervated brain regions. *J. Neurosci.* 10, 1124–1133.
- Girault, J. A., Valjent, E., Caboche, J., and Hervé, D. (2007). ERK2: a logical AND gate critical for drug-induced plasticity? *Curr. Opin. Pharmacol.* 7, 77–85. doi: 10.1016/j.coph.2006.08.012
- Haney, M., Ward, A. S., Foltin, R. W., and Fischman, M. W. (2001). Effects of ecopipam, a selective dopamine D1 antagonist, on smoked cocaine self-administration by humans. *Psychopharmacology* 155, 330–337. doi: 10.1007/s002130100725
- Hara, Y., and Pickel, V. M. (2005). Overlapping intracellular and differential synaptic distributions of dopamine D1 and glutamate NMDA receptors in rat nucleus accumbens. *J. Comp. Neurol.* 492, 442–455. doi: 10.1002/cne.20740
- Hemmings, H. C. Jr., Greengard, P., Tung, H. Y., and Cohen, P. (1984). DARPP-32, a dopamine-regulated neuronal phosphoprotein, is a potent inhibitor of protein phosphatase-1. *Nature* 310, 503–505. doi: 10.1038/310503a0
- Hervé, D. (2011). Identification of a specific assembly of the g protein golf as a critical and regulated module of dopamine and adenosine-activated cAMP pathways in the striatum. *Front. Neuroanat.* 5:48. doi: 10.3389/fnana.2011.00048
- Heusner, C., and Palmiter, R. D. (2005). Expression of mutant NMDA receptors in dopamine D1 receptor containing cells prevents cocaine sensitization and decreases cocaine preference. *J. Neurosci.* 25, 6651–6657. doi: 10.1523/JNEUROSCI.1474-05.2005
- Hiroi, N., Fienberg, A. A., Haile, C. N., Alburges, M., Hanson, G. R., Greengard, P., et al. (1999). Neuronal and behavioural abnormalities in striatal function in DARPP-32-mutant mice. *Eur. J. Neurosci.* 11, 1114–1118. doi: 10.1046/j.1460-9568.1999.00570.x
- Hu, J. L., Liu, G., Li, Y. C., Gao, W. J., and Huang, Y. Q. (2010). Dopamine D1 receptor-mediated NMDA receptor insertion depends on Fyn but not Src kinase pathway in prefrontal cortical neurons. *Mol. Brain* 3, 20. doi: 10.1186/1756-6606-3-20
- Huang, Q., Zhou, D., Chase, K., Gusella, J. F., Aronin, N., and DiFiglia, M. (1992). Immunohistochemical localization of the D1 dopamine receptor in rat brain reveals its axonal transport, pre- and postsynaptic localization, and prevalence in the basal ganglia, limbic system, and thalamic reticular nucleus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 89, 11988–11992. doi: 10.1073/pnas.89.24.11988
- Hyman, S. E., Malenka, R. C., and Nestler, E. J. (2006). Neural mechanisms of addiction: the role of reward-related learning and memory. *Annu. Rev. Neurosci.* 29, 565–598. doi: 10.1146/annurev.neuro.29.051605.113009
- Ibba, F., Vinci, S., Spiga, S., Peana, A. T., Assaretti, A. R., Spina, L., et al. (2009). Ethanol-induced extracellular signal regulated kinase: role of dopamine D1 receptors. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* 33, 858–867. doi: 10.1111/j.1530-0277.2009.00907.x
- Kalivas, P. W. (2009). The glutamate homeostasis hypothesis of addiction. *Nat. Rev. Neurosci.* 10, 561–572. doi: 10.1038/nrn2515
- Kampman, K. M., Dackis, C., Lynch, K. G., Pettinati, H., Tirado, C., Gariti, P., et al. (2006). A double-blind, placebo-controlled trial of amantadine, propranolol, and their combination for the treatment of cocaine dependence in patients with severe cocaine withdrawal symptoms. *Drug Alcohol Depend.* 85, 129–137. doi: 10.1016/j.drugalcdep.2006.04.002
- Kampman, K. M., Dackis, C., Pettinati, H. M., Lynch, K. G., Sparkman, T., and O'Brien, C. P. (2011). A double-blind, placebo-controlled pilot trial of acamprosate for the treatment of cocaine dependence. *Addict. Behav.* 36, 217–221. doi: 10.1016/j.addbeh.2010.11.003
- Karler, R., Calder, L. D., Chaudhry, I. A., and Turkanis, S. A. (1989). Blockade of 'reverse tolerance' to cocaine and amphetamine by MK-801. *Life Sci.* 45, 599–606. doi: 10.1016/0024-3205(89)90045-3
- Kebabian, J. W., and Calne, D. B. (1979). Multiple receptors for dopamine. *Nature* 277, 93–96. doi: 10.1038/277093a0
- Kelley, A. E. (2004). Memory and addiction: shared neural circuitry and molecular mechanisms. *Neuron* 44, 161–179. doi: 10.1016/j.neuron.2004.09.016
- Kenny, P. J., Boutrel, B., Gaspatini, F., Koob, G. F., and Markou, A. (2005). Metabotropic glutamate 5 receptor blockade may attenuate cocaine self-administration by decreasing brain reward function in rats. *Psychopharmacology* 179, 247–254. doi: 10.1007/s00213-004-2069-2
- Kenny, P. J., Paterson, N. E., Boutrel, B., Semenova, S., Harrison, A. A., Gasparini, E., et al. (2003). Metabotropic glutamate 5 receptor antagonist MPEP decreased nicotine and cocaine self-administration but not nicotine and cocaine-induced facilitation of brain reward function in rats. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1003, 415–418. doi: 10.1196/annals.1300.040
- Kleckner, N. W., and Dingleline, R. (1988). Requirement for glycine in activation of NMDA-receptors expressed in *Xenopus* oocytes. *Science* 241, 835–837. doi: 10.1126/science.2841759
- Köhr, G., and Seeburg, P. H. (1996). Subtype-specific regulation of recombinant NMDA receptor-channels by protein tyrosine kinases of the src family. *J. Physiol.* 492, 445–452.
- Krapivinsky, G., Krapivinsky, L., Manasian, Y., Ivanov, A., Tyzio, R., Pellegrino, C., et al. (2003). The NMDA receptor is coupled to the ERK pathway by a direct interaction between NR2B and Ras-GRF1. *Neuron* 40, 775–784. doi: 10.1016/S0896-6273(03)00645-7
- Kravitz, A. V., Freeze, B. S., Parker, P. R. L., Kay, K., Thwin, M. T., Deisseroth, K., et al. (2010). Regulation of parkinsonian motor behaviours by optogenetic control of basal ganglia circuitry. *Nature* 466, 622–626. doi: 10.1038/nature09159

- Kumaresan, V., Yuan, M., Yee, J., Famous, K. R., Anderson, S. M., Schmidt, H. D., et al. (2009). Metabotropic glutamate receptor 5 (mGluR5) antagonists attenuate cocaine priming and cue-induced reinstatement of cocaine seeking. *Behav. Brain Res.* 14, 238–244. doi: 10.1016/j.bbr.2009.03.039
- Kunii, Y., Hyde, T. M., Ye, T., Li, C., Kolachana, B., Dickinson, D., et al. (2013). Revisiting DARPP-32 in postmortem human brain: changes in schizophrenia and bipolar disorder and genetic associations with t-DARPP-32 expression. *Mol. Psychiatry* doi: 10.1038/mp.2012.174 [Epub ahead of print].
- Lau, C. G., and Zukin, R. S. (2007). NMDA receptor trafficking in synaptic plasticity and neuropsychiatric disorders. *Nat. Rev. Neurosci.* 8, 413–426. doi: 10.1038/nrn2153
- Laube, B., Hirai, H., Sturgess, M., Betz, H., and Kuhse, J. (1997). Molecular determinants of agonist discrimination by NMDA receptor subunits: analysis of the glutamate binding site on the NR2B subunit. *Neuron* 18, 493–503. doi: 10.1016/S0896-6273(00)81249-0
- Lavaur, J., Bernard, F., Trifilieff, P., Pascoli, V., Kappes, V., Pagès, C., et al. (2007). A TAT-DEF-Elk-1 peptide regulates the cytonuclear trafficking of Elk-1 and controls cytoskeleton dynamics. *J. Neurosci.* 27, 14448–14458. doi: 10.1523/JNEUROSCI.2279-07.2007
- Le Moine, C., and Bloch, B. (1995). D1 and D2 dopamine receptor gene expression in the rat striatum: sensitive cRNA probes demonstrate prominent segregation of D1 and D2 mRNAs in distinct neuronal populations of the dorsal and ventral striatum. *J. Comp. Neurol.* 355, 418–426. doi: 10.1002/cne.903550308
- Lee, B., Platt, D. M., Rowlett, J. K., Adewale, A. S., and Spealman, R. D. (2005). Attenuation of behavioral effects of cocaine by the metabotropic glutamate receptor 5 antagonist 2-methyl-6-(phenylethynyl)-pyridine in squirrel monkeys: comparison with dizocilpine. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 312, 1232–1240. doi: 10.1124/jpet.104.078733
- Lee, F. J. S., Xue, S., Pei, L., Vukusic, B., Chéry, N., Wang, Y., et al. (2002). Dual regulation of NMDA receptor functions by direct protein-protein interactions with the dopamine D1 receptor. *Cell* 111, 219–230. doi: 10.1016/S0092-8674(02)00962-5
- Leonard, A. S., and Hell, J. W. (1997). Cyclic AMP-dependent protein kinase and protein kinase C phosphorylate N-methyl-D-aspartate receptors at different sites. *J. Biol. Chem.* 272, 12107–12115. doi: 10.1074/jbc.272.18.12107
- Lévesque, D., Diaz, J., Pilon, C., Martres, M. P., Giros, B., Souil, E., et al. (1992). Identification, characterization, and localization of the dopamine D3 receptor in rat brain using 7-[3H]hydroxy-N,N-di-n-propyl-2-aminotetralin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 89, 8155–8159. doi: 10.1073/pnas.89.17.8155
- Liu, X. Y., Chu, X. P., Mao, L. M., Wang, M., Lan, H. X., Li, M. H., et al. (2006). Modulation of D2R-NR2B interactions in response to cocaine. *Neuron* 52, 897–909. doi: 10.1016/j.neuron.2006.10.011
- Lobo, M. K., and Nestler, E. J. (2011). The striatal balancing act in drug addiction: distinct roles of direct and indirect pathway medium spiny neurons. *Front. Neuroanat.* 5:41. doi: 10.3389/fnana.2011.00041
- Lohse, M. J., Nikolaev, V. O., Hein, P., Hoffmann, C., Vilardaga, J. P., and Bunemann, M. (2008). Optical techniques to analyze real-time activation and signaling of G-protein-coupled receptors. *Trends Pharmacol. Sci.* 29, 159–165. doi: 10.1016/j.tips.2007.12.002
- Mao, L., and Wang, J. Q. (2000). Distinct inhibition of acute cocaine-stimulated motor activity following microinjection of a group III metabotropic glutamate receptor agonist into the dorsal striatum of rats. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 67, 93–101. doi: 10.1016/S0091-3057(00)00307-5
- Mardikian, P. N., LaRowe, S. D., Hedden, S., Kalivas, P. W., and Malcolm, R. J. (2007). An open-label trial of N-acetylcysteine for the treatment of cocaine dependence: a pilot study. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry* 31, 389–394. doi: 10.1016/j.pnpbp.2006.10.001
- Mayer, M. L., Westbrook, G., and Guthrie, P. B. (1984). Voltage-dependent block by Mg²⁺ of NMDA responses in spinal cord neurones. *Nature* 309, 261–263. doi: 10.1038/309261a0
- Mazzucchelli, C., Vantaggiato, C., Ciamei, A., Fasano, S., Pakhotin, P., Krezel, W., et al. (2002). Knockout of ERK1 MAP kinase enhances synaptic plasticity in the striatum and facilitates striatal-mediated learning and memory. *Neuron* 34, 807–820. doi: 10.1016/S0896-6273(02)00716-X
- Menniti, F. S., Faraci, W. S., and Schmidt, C. J. (2006). Phosphodiesterases in the CNS: targets for drug development. *Nat. Rev. Drug Discov.* 5, 660–670. doi: 10.1038/nrd2058
- Miller, C. A., and Marshall, J. F. (2005). Molecular substrates for retrieval and reconsolidation of cocaine-associated contextual memory. *Neuron* 47, 873–884. doi: 10.1016/j.neuron.2005.08.006
- Miner, L. L., Drago, J., Chamberlain, P. M., Donovan, D., and Uhl, G. R. (1995). Retained cocaine conditioned place preference in D1 receptor deficient mice. *Neuroreport* 6, 2314–2316. doi: 10.1097/00001756-199511270-00011
- Missale, C., Nash, S. R., Robinson, S. W., Jaber, M., and Caron, M. G. (1998). Dopamine receptors: from structure to function. *Physiol. Rev.* 78, 189–225.
- Mitrano, D. A., and Smith, Y. (2007). Comparative analysis of the subcellular and subsynaptic localization of mGluR1a and mGluR5 metabotropic glutamate receptors in the shell and core of the nucleus accumbens in rat and monkey. *J. Comp. Neurol.* 500, 788–806. doi: 10.1002/cne.21214
- Mothet, J. P., Parent, A. T., Wolosker, H., Brady, R. O., Linden, D. J., Ferris, C. D., et al. (2000). D-serine is an endogenous ligand for the glycine site of the N-methyl-D-aspartate receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 97, 4926–4931. doi: 10.1073/pnas.97.9.4926
- Nai, Q., Li, S., Wang, S. H., Liu, J., Lee, F. J. S., Frankland, P. W., et al. (2010). Uncoupling the D1-N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor complex promotes NMDA-dependent long-term potentiation and working memory. *Biol. Psychiatry* 67, 246–254. doi: 10.1016/j.biopsych.2009.08.011
- Nakazawa, T., Komai, S., Tezuka, T., Hisatsune, C., Umemori, H., Semba, K., et al. (2001). Characterization of Fyn-mediated tyrosine phosphorylation sites on GluR epsilon 2 (NR2B) subunit of the N-methyl-D-aspartate receptor. *J. Biol. Chem.* 276, 693–699. doi: 10.1074/jbc.M008085200
- Nestler, E. J. (2004). Historical review: molecular and cellular mechanisms of opiate and cocaine addiction. *Trends Pharmacol. Sci.* 25, 210–218. doi: 10.1016/j.tips.2004.02.005
- Neve, K. A., Seamans, J. K., and Trantham-Davidson, H. (2004). Dopamine receptor signaling. *J. Recept. Signal Transduct. Res.* 24, 165–205. doi: 10.1081/RRS-200029981
- Niswender, C. M., and Conn, P. J. (2010). Metabotropic glutamate receptors: physiology, pharmacology, and disease. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 50, 295–322. doi: 10.1146/annurev.pharmtox.011008.145533
- Nguyen, T. H., Liu, J., and Lombroso, P. J. (2002). Striatal enriched phosphatase 61 dephosphorylates Fyn at phosphotyrosine 420. *J. Biol. Chem.* 277, 24274–24279. doi: 10.1074/jbc.M111683200
- Nishi, A., Snyder, G. L., Nairn, A. C., and Greengard, P. (1999). Role of calcineurin and protein phosphatase-2A in the regulation of DARPP-32 dephosphorylation in neostriatal neurons. *J. Neurochem.* 72, 2015–2021. doi: 10.1046/j.1471-4159.1999.0722015.x
- Pascoli, V., Besnard, A., Hervé, D., Pagès, C., Heck, N., Girault, J.-A., et al. (2011a). Cyclic adenosine monophosphate-independent tyrosine phosphorylation of NR2B mediates cocaine-induced extracellular signal-regulated kinase activation. *Biol. Psychiatry* 69, 218–227. doi: 10.1016/j.biopsych.2010.08.031
- Pascoli, V., Turiault, M., and Lüscher, C. (2011b). Reversal of cocaine-evoked synaptic potentiation resets drug-induced adaptive behaviour. *Nature* 481, 71–75. doi: 10.1038/nature10709
- Paul, S., Snyder, G. L., Yokakura, H., Picciotto, M. R., Nairn, A. C., and Lombroso, P. J. (2000). The dopamine/D1 receptor mediates the phosphorylation and inactivation of the protein tyrosine phosphatase STEP via a PKA-dependent pathway. *J. Neurosci.* 20, 5630–5638.
- Pei, L., Lee, F. J. S., Myszczynska, A., Vukusic, B., and Liu, F. (2004). Regulation of dopamine D1 receptor function by physical interaction with the NMDA receptors. *J. Neurosci.* 24, 1149–1158. doi: 10.1523/JNEUROSCI.3922-03.2004
- Perroy, J., Raynaud, F., Homburger, V., Rousset, M. C., Telley, L., Bockaert, J., et al. (2008). Direct interaction enables cross-talk between ionotropic and group I metabotropic glutamate receptors. *J. Biol. Chem.* 283, 6799–6805. doi: 10.1074/jbc.M705661200
- Pierce, R. C., Bell, K., Duffy, P., and Kalivas, P. W. (1996). Repeated cocaine augments excitatory amino acid transmission in the nucleus accumbens only in rats having developed behavioral sensitization. *J. Neurosci.* 16, 1550–1560.
- Platt, D. M., Rowlett, J. K., and Spealman, R. D. (2008). Attenuation of cocaine self-administration in squirrel monkeys following repeated administration of the mGluR5 antagonist MPEP: comparison with dizocilpine. *Psychopharmacology* 200, 167–176. doi: 10.1007/s00213-008-1191-y
- Pulido, R., Zúñiga, A., and Ullrich, A. (1998). PTP-SL and STEP protein tyrosine phosphatases regulate the activation of the extracellular signal-regulated kinases

- ERK1 and ERK2 by association through a kinase interaction motif. *EMBO J.* 17, 7337–7350. doi: 10.1093/emboj/17.24.7337
- Ramsey, A. J., Laakso, A., Cyr, M., Sotnikova, T. D., Salahpour, A., Medvedev, I. O., et al. (2008). Genetic NMDA receptor deficiency disrupts acute and chronic effects of cocaine but not amphetamine. *Neuropsychopharmacology* 33, 2701–2714. doi: 10.1038/sj.npp.1301663
- Rivera, A., Alberti, I., Martin, A. B., Narvaez, J. A., De la Calle, A., and Moratalla, R. (2002). Molecular phenotype of rat striatal neurons expressing the dopamine D5 receptor subtype. *Eur. J. Neurosci.* 16, 2049–2058. doi: 10.1046/j.1460-9568.2002.02280.x
- Robbins, T., and Everitt, B. J. (2002). Limbic-striatal memory systems and drug addiction. *Neurobiol. Learn. Mem.* 78, 625–636. doi: 10.1006/nlme.2002.4103
- Robinson, A. J., and Nestler, E. J. (2011). Transcriptional and epigenetic mechanisms of addiction. *Nat. Rev. Neurosci.* 12, 623–637. doi: 10.1038/nrn3111
- Romach, M. K., Glue, P., Kampman, K., Kaplan, H. L., Somer, G. R., Poole, S., et al. (1999). Attenuation of the euphoric effects of cocaine by the dopamine D1/D5 antagonist ecopipam (SCH 39166). *Arch. Gen. Psychiatry* 56, 1101–1106. doi: 10.1001/archpsyc.56.12.1101
- Salter, M. W., and Kalia, L. V. (2004). Src kinases: a hub for NMDA receptor regulation. *Nat. Rev. Neurosci.* 5, 317–328. doi: 10.1038/nrn1368
- Salzmann, J., Marie-Claire, C., Le Guen, S., Roques, B. P., and Noble, F. (2003). Importance of ERK activation in behavioral and biochemical effects induced by MDMA in mice. *Br. J. Pharmacol.* 140, 831–838. doi: 10.1038/sj.bjp.0705506
- Schenk, S., Valadez, A., McNamara, C., House, D. T., Higley, D., Bankson, M. G., et al. (1993). Development and expression of sensitization to cocaine's reinforcing properties: role of NMDA receptors. *Psychopharmacology* 111, 332–338. doi: 10.1007/BF02244949
- Schiffmann, S. N., Lledo, P. M., and Vincent, J. D. (1995). Dopamine D1 receptor modulates the voltage-gated sodium current in rat striatal neurones through a protein kinase A. *J. Physiol.* 483, 95–107.
- Schoepp, D. D., and Conn, P. J. (1993). Metabotropic glutamate receptors in brain function and pathology. *Trends Pharmacol. Sci.* 14, 13–20. doi: 10.1016/0165-6147(93)90107-U
- Schultz, W. (2010). Dopamine signals for reward value and risk: basic and recent data. *Behav. Brain Funct.* 6, 24. doi: 10.1186/1744-9081-6-24
- Schumann, J., and Yaka, R. (2009). Prolonged withdrawal from repeated noncontingent cocaine exposure increases NMDA receptor expression and ERK activity in the nucleus accumbens. *J. Neurosci.* 29, 6955–6963. doi: 10.1523/JNEUROSCI.1329-09.2009
- Scott, D. B., Blanpied, T. A., Swanson, G. T., Zhang, C., and Ehlers, M. D. (2001). An NMDA receptor ER retention signal regulated by phosphorylation and alternative splicing. *J. Neurosci.* 21, 3063–3072.
- Scott, L., Zelenin, S., Malmersjö, S., Kowalewski, J. M., Markus, E. Z., Nairn, A. C., et al. (2006). Allosteric changes of the NMDA receptor trap diffusible dopamine 1 receptors in spines. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 103, 762–767. doi: 10.1073/pnas.050557103
- Sgambato, V., Vanhoutte, P., Pages, C., Rogard, M., Hipskind, R., Besson, M. J., et al. (1998). In vivo expression and regulation of Elk-1, a target of the extracellular-regulated kinase signaling pathway, in the adult rat brain. *J. Neurosci.* 18, 214–226.
- Smiley, J. F., Levey, A. I., Ciliax, B. J., and Goldman-Rakic, P. S. (1994). D1 dopamine receptor immunoreactivity in human and monkey cerebral cortex: predominant and extrasynaptic localization in dendritic spines. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 91, 5720–5724. doi: 10.1073/pnas.91.12.5720
- Smith, R. J., Lobo, M. K., Spencer, S., and Kalivas, P. W. (2013). Cocaine-induced adaptations in D1 and D2 accumbens projection neurons (a dichotomy not necessarily synonymous with direct and indirect pathways). *Curr. Opin. Neurobiol.* 23, 546–552. doi: 10.1016/j.conb.2013.01.026
- Snyder, E. M., Nong, Y., Almeida, C. G., Paul, S., Moran, T., Choi, E. Y., et al. (2005). Regulation of NMDA receptor trafficking by amyloid-beta. *Nat. Neurosci.* 8, 1051–1058. doi: 10.1038/nn1503
- Snyder, G. L., Fienberg, A. A., Haganir, R. L., and Greengard, P. (1998). A dopamine/D1 receptor/protein kinase A/dopamine- and cAMP-regulated phosphoprotein (Mr 32 kDa)/protein phosphatase-1 pathway regulates dephosphorylation of the NMDA receptor. *J. Neurosci.* 18, 10297–10303.
- Stipanovich, A., Valjent, E., Matamalas, M., Nishi, A., Ahn, J. H., Maroteaux, M., et al. (2008). A phosphatase cascade by which rewarding stimuli control nucleosomal response. *Nature* 453, 879–884. doi: 10.1038/nature06994
- Sun, W. L., Zhou, L., Quinones-Jenab, V., and Jenab, S. (2009). Cocaine effects on dopamine and NMDA receptors interactions in the striatum of Fischer rats. *Brain Res. Bull.* 80, 377–381. doi: 10.1016/j.brainresbull.2009.08.016
- Surmeier, D. J., Bargas, J., Hemmings, H. C., Nairn, A. C., and Greengard, P. (1995). Modulation of calcium currents by a D1 dopaminergic protein kinase/phosphatase cascade in rat neostriatal neurons. *Neuron* 14, 385–397. doi: 10.1016/0896-6273(95)90294-5
- Tezuka, T., Umemori, H., Akiyama, T., Nakanishi, S., and Yamamoto, T. (1999). PSD-95 promotes Fyn-mediated tyrosine phosphorylation of the N-methyl-D-aspartate receptor subunit NR2A. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 96, 435–440. doi: 10.1073/pnas.96.2.435
- Tingley, W. G., Ehlers, M. D., Kameyama, K., Doherty, C., Ptak, J. B., Riley, C. T., et al. (1997). Characterization of protein kinase A and protein kinase C phosphorylation of the N-methyl-D-aspartate receptor NR1 subunit using phosphorylation site-specific antibodies. *J. Biol. Chem.* 272, 5157–5166. doi: 10.1074/jbc.272.8.5157
- Trifilieff, P., Lavaur, J., Pascoli, V., Kappes, V., Bami-Cherrier, K., Pages, C., et al. (2009). Endocytosis controls glutamate-induced nuclear accumulation of ERK. *Mol. Cell. Neurosci.* 41, 325–336. doi: 10.1016/j.mcn.2009.04.006
- Valjent, E., Bertran-Gonzalez, J., Aubier, B., Greengard, P., Hervé, D., and Girault, J. A. (2010). Mechanisms of locomotor sensitization to drugs of abuse in a two-injection protocol. 35, 401–415. doi: 10.1038/npp.2009.143.
- Valjent, E., Corvol, J. C., Pages, C., Besson, M. J., Maldonado, R., and Caboche, J. (2000). Involvement of the extracellular signal-regulated kinase cascade for cocaine-rewarding properties. *J. Neurosci.* 20, 8701–8709.
- Valjent, E., Corvol, J. C., Trzaskos, J. M., Girault, J. A., and Hervé, D. (2006a). Role of the ERK pathway in psychostimulant-induced locomotor sensitization. *BMC Neurosci.* 7:20. doi: 10.1186/1471-2202-7-20
- Valjent, E., Corbillé, A. G., Bertran-Gonzalez, J., Hervé, D., and Girault, J. A. (2006b). Inhibition of ERK pathway or protein synthesis during reexposure to drugs of abuse erases previously learned place preference. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 103, 2932–2937. doi: 10.1073/pnas.0511030103
- Valjent, E., Pagès, C., Hervé, D., Girault, J. A., and Caboche, J. (2004). Addictive and non-addictive drug induce distinct and specific pattern of ERK activation in mouse brain. *Eur. J. Neurosci.* 19, 1826–1836. doi: 10.1111/j.1460-9568.2004.03278.x
- Valjent, E., Pages, C., Rogard, M., Besson, M. J., Maldonado, R., and Caboche, J. (2001). Delta 9-tetrahydrocannabinol-induced MAPK/ERK and Elk-1 activation in vivo depends on dopaminergic transmission. *Eur. J. Neurosci.* 14, 342–352. doi: 10.1046/j.0953-816x.2001.01652.x
- Valjent, E., Pascoli, V., Svenningsson, P., Paul, S., Enslen, H., Corvol, J.-C., et al. (2005). Regulation of a protein phosphatase cascade allows convergent dopamine and glutamate signals to activate ERK in the striatum. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 102, 491–496. doi: 10.1073/pnas.0408305102
- Vezina, P., and Queen, A. L. (2000). Induction of locomotor sensitization by amphetamine requires the activation of NMDA receptors in the rat ventral tegmental area. *Psychopharmacology* 151, 184–191. doi: 10.1007/s002130000463
- Walaas, S. I., Aswad, D. W., and Greengard, P. (1983). A dopamine- and cyclic AMP-regulated phosphoprotein enriched in dopamine-innervated brain regions. *Nature* 301, 69–71. doi: 10.1038/301069a0
- Walaas, S. I., Cala, S., and Greengard, P. (1989). Localization of ARPP-90, a major 90 kiloDalton basal ganglion-enriched substrate for cyclic AMP-dependent protein kinase, in striatonigral neurons in the rat brain. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 5, 149–157. doi: 10.1016/0169-328X(89)90006-5
- Walaas, S. I., and Greengard, P. (1993). ARPP-39, a membrane-associated substrate for cyclic AMP-dependent protein kinase present in neostriatal neurons. *J. Mol. Neurosci.* 4, 73–88. doi: 10.1007/BF02782120
- Walaas, S. I., Hemmings, H. C., Greengard, P., and Nairn, A. C. (2011). Beyond the dopamine receptor: regulation and roles of serine/threonine protein phosphatases. *Front. Neuroanat.* 5:50. doi: 10.3389/fnana.2011.00050
- White, F. J., Joshi, A., Koeltzow, T. E., and Hu, X. T. (1998). Dopamine receptor antagonists fail to prevent induction of cocaine sensitization. *Neuropsychopharmacology* 18, 26–40. doi: 10.1016/S0893-133X(97)00093-6
- Wickens, J. R. (2009). Synaptic plasticity in the basal ganglia. *Behav. Brain Res.* 199, 119–128. doi: 10.1016/j.bbr.2008.10.030
- Winhusen, T., Somoza, E., Sarid-Segal, O., Goldsmith, R. J., Harrer, J. M., Coleman, F. S., et al. (2007). A double-blind, placebo-controlled trial of reserpine for

- the treatment of cocaine dependence. *Drug Alcohol Depend.* 91, 205–212. doi: 10.1016/j.drugalcdep.2007.05.021
- Wise, R. A., and Bozarth, M. A. (1987). A psychomotor stimulant theory of addiction. *Psychol. Rev.* 94, 469–492. doi: 10.1037/0033-295X.94.4.469
- Wittmann, M., Marino, M. J., Henze, D. A., Seabrook, G. R., and Conn, P. J. (2005). Clozapine potentiation of N-Methyl-D-aspartate receptor currents in the nucleus accumbens: role of NR2B and protein kinase A/Src kinases. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 313, 594–603. doi: 10.1124/jpet.104.080200
- Wolf, M. E. (1998). The role of excitatory amino acids in behavioral sensitization to psychomotor stimulants. *Prog. Neurobiol.* 54, 679–720. doi: 10.1016/S0301-0082(97)00090-7
- Woods, A. S., Ciruela, F., Fuxe, K., Agnati, L. F., Lluis, C., Franco, R., et al. (2005). Role of electrostatic interaction in receptor – receptor heteromerization. *J. Mol. Neurosci.* 26, 125–132. doi: 10.1385/JMN:26:2-3:125
- Xu, M., Guo, Y., Vorhees, C. V., and Zhang, J. (2000). Behavioral responses to cocaine and amphetamine administration in mice lacking the dopamine D1 receptor. *Brain Res.* 852, 198–207. doi: 10.1016/S0006-8993(99)02258-1
- Xu, M., Hu, X. T., Cooper, D. C., Moratalla, R., Graybiel, A. M., White, F. J., et al. (1994). Elimination of cocaine-induced hyperactivity and dopamine-mediated neurophysiological effects in dopamine D1 receptor mutant mice. *Cell* 79, 945–955. doi: 10.1016/0092-8674(94)90026-4
- Yaka, R., He, D. Y., Phamluong, K., and Ron, D. (2003). Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP(1-38)) enhances N-methyl-D-aspartate receptor function and brain-derived neurotrophic factor expression via RACK1. *J. Biol. Chem.* 278, 9630–9638. doi: 10.1074/jbc.M209141200
- Yaka, R., Thornton, C., Vagts, A. J., Phamluong, K., Bonci, A., and Ron, D. (2002). NMDA receptor function is regulated by the inhibitory scaffolding protein, RACK1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 99, 5710–5715. doi: 10.1073/pnas.062046299
- Young, M. J., Sisti, D. A., Rimon-Greenspan, H., Schwartz, J. L., and Caplan, A. L. (2012). Immune to addiction: the ethical dimensions of vaccines against substance abuse. *Nat. Immunol.* 13, 521–524. doi: 10.1038/ni.2321
- Zhang, Y., Loonam, T. M., Noailles, P. H., and Angulo, J. A. (2001). Comparison of cocaine- and glutamate overflow in somatodendritic and terminal field regions of the rat brain during acute, chronic, and early withdrawal conditions. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 937, 93–120. doi: 10.1111/j.1749-6632.2001.tb03560.x
- Zweifel, L. S., Argilli, E., Bonci, A., and Palmiter, R. D. (2008). Role of NMDA receptors in dopamine neurons for plasticity and addictive behaviors. *Neuron* 59, 486–496. doi: 10.1016/j.neuron.2008.05.028

Conflict of Interest Statement: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Received: 29 October 2013; paper pending published: 22 November 2013; accepted: 19 December 2013; published online: 08 January 2014.

Citation: Cahill E, Salery M, Vanhoutte P and Caboche J (2014) Convergence of dopamine and glutamate signaling onto striatal ERK activation in response to drugs of abuse. *Front. Pharmacol.* 4:172. doi: 10.3389/fphar.2013.00172

This article was submitted to *Neuropharmacology*, a section of the journal *Frontiers in Pharmacology*.

Copyright © 2014 Cahill, Salery, Vanhoutte and Caboche. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) or licensor are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

A new automated 3D detection of synaptic contacts reveals the formation of cortico-striatal synapses upon cocaine treatment in vivo

Nicolas Heck · Marc Dos Santos · Brahim Amairi · Marine Salery ·
Antoine Besnard · Etienne Herzog · Thomas Boudier ·
Peter Vanhoutte · Jocelyne Caboche

Received: 1 April 2014 / Accepted: 30 June 2014 / Published online: 8 July 2014
© Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2014

Abstract Addiction can be considered as a form of neuronal adaptation within the reward circuitry. Upon psychostimulant administration, long-term behavioral adaptations are associated with synaptic plasticity and morphological changes of medium spiny neurons (MSN) from the striatum. Increased spine density onto MSN in response to chronic cocaine exposure in mice has been described for more than a decade, but no evidence indicates that these newly formed spines establish connections. We developed a method for labeling, automated detection and morphological analysis of synaptic contacts. Individual

labeling of neurons in mice that express the Vesicular GLUamate Transporter-1 fused to Venus allows visualization of both dendritic spines and axonal boutons. Automated three-dimensional segmentation and morphometric analysis retrieve information on thousands of synapses at high resolution. We used this method to demonstrate that new cortico-striatal connections are formed in the striatum upon chronic cocaine. We also show that the cortical input weight is preserved over other cerebral inputs and that the newly formed spines contact pre-existing axonal boutons. Our results pave the way for other studies, since our method can be applied to any other neuronal type as demonstrated herein for glutamatergic connections on pyramidal neurons and Purkinje cells.

N. Heck (✉) · M. Dos Santos · B. Amairi · M. Salery ·
A. Besnard · P. Vanhoutte · J. Caboche
INSERM, UMR-S 1130, Neuroscience Paris Seine, 75005 Paris,
France
e-mail: nicolas.heck@snv.jussieu.fr

N. Heck · M. Dos Santos · B. Amairi · M. Salery ·
A. Besnard · P. Vanhoutte · J. Caboche
CNRS, UMR 8246, Neuroscience Paris Seine, 75005 Paris,
France

N. Heck · M. Dos Santos · B. Amairi · M. Salery ·
A. Besnard · T. Boudier · P. Vanhoutte · J. Caboche
Sorbonne Universités, UPMC Université Paris 06, UMR-S 8246,
Neuroscience Paris Seine, 75005 Paris, France

A. Besnard
Center for Regenerative Medicine, Massachusetts General
Hospital, Boston, MA, USA

E. Herzog
Université Bordeaux, Institut Interdisciplinaire de
Neurosciences, UMR 5297, 33000 Bordeaux, France

E. Herzog
CNRS, Institut Interdisciplinaire de Neurosciences, UMR 5297,
33000 Bordeaux, France

Keywords Cocaine · Striatum · Dendritic spine ·
Axonal bouton · 3D segmentation · VGLUT1

Introduction

The striatum, the entry structure of the basal ganglia, plays a key role in action selection and execution of movements as well as motivation. These diverse functions of the striatum require the processing of glutamate inputs arising from the entire cerebral cortex and thalamus together with dopamine (DA) signals, which converge onto the medium-sized spiny neurons (MSNs), the major population of striatal neurons (Hyman et al. 2006; Sesack and Grace 2010). Drugs of abuse mimic a reward-related learning signal by artificially increasing extracellular DA in the striatum. This results in abnormal, chemically driven “learning” of drug consumption, which can escape any control whatever deleterious the consequences may be, thus corresponding to the definition of addiction. It is now well established that

these behavioural adaptations rely on long-term adaptation of MSN.

Upon psychostimulant, and more specifically cocaine, administration cortico-striatal synapses undergo long-term plasticity (Lüscher and Malenka 2011) and the control of glutamate level at this site is the focus of therapeutic strategies (Kalivas and Volkow 2011). Recently, evidence for a causal link between cortico-striatal plasticity and cocaine-induced long-term behavioural alteration has been established in the protocol of locomotor sensitization (Pascoli et al. 2011). Furthermore, chronic administration of cocaine is known, for more than a decade, to increase dendritic spine density onto MSNs (Robinson and Kolb 1999). Nevertheless, an issue that was never addressed so far is whether this increase in dendritic spines corresponds to increases in cortico-striatal connectivity and thus contributes to long-term adaptations and plasticity of MSNs. In particular, it has not been determined whether the cortical input weight is preserved or changed over inputs from other brain structures. Furthermore, the mode of new synapses formation in the adult brain, which is under debate, remains to be determined. To address these important questions, it is required to visualize both the dendritic spine and the cortical inputs that connect on them. Since it is assumed that plastic changes associated with learning or addiction imply increase in connectivity, there is indeed a need for techniques that would allow the analysis of both pre and postsynaptic structures (Hübener and Bonhoeffer 2010; Russo et al. 2010; DeFelipe 2010; Osten and Margrie 2013). Here, we developed a method that allows precise three-dimensional (3D) automated morphological analysis of synaptic connections. We use this method to address the questions related to the formation of new connections upon cocaine administration. We demonstrate that new cortico-striatal connections are formed upon chronic cocaine administration and characterize the mode of formation of the synapses. We propose that this method can be adapted to multiple model systems of neuronal plasticity in the brain.

Materials and methods

Slice preparation

Animal care was conducted in accordance with standard ethical guidelines (NIH publication no. 85-23, revised 1985 and European Committee Guidelines on the Care and Use of Laboratory Animals 86/609/EEC), and the experiments were approved by the local ethic committee. Mice were deeply anesthetized with an intraperitoneal injection of

pentobarbital and perfused intracardially with 30 ml of paraformaldehyde (PFA) at 1.5 % for morphological analysis and 4 % for immunofluorescence in 0.1 M phosphate buffer, pH 7.4 at 4 °C. The brain was removed from the skull and placed for 1 h at 4 °C into 1.5 or 4 % PFA. Sections of 150 µm thickness were cut in the frontal plane using a vibratome (Leica).

Diolistic labeling

50 mg of tungsten beads (1.3 µm diameter, Biorad) was mixed with 3 mg of solid DiI (1,1'-dioctadecyl-3,3,3',3'-tetramethylindocarbocyanine perchlorate; Molecular Probes) dissolved in methylene chloride. DiI-coated beads were resuspended in 3.5 ml water and sonicated to prevent beads' aggregation. The beads were coated on the inner surface of a PolyVinylPyrrolidone (Sigma-Adrich) pretreated Teflon tube from which cartridges were cut. Beads were delivered through a 3-µm pore-size filter (Isopore polycarbonate, Millipore) on brain slices using helium gas pressure (150 psi) through the genegun device (BioRad) (Gan et al. 2000). After labeling, slices were kept in buffer at room temperature (RT) for at least 2 h and mounted in MOWIOL 4-88.

Confocal microscopy image acquisition and deconvolution

Principles for image acquisition and deconvolution have been extensively described in Heck et al. (2012). Image stacks were acquired in 16 bits using a Confocal Laser Scanning Microscope (SP5, Leica) equipped with galvo-electric stage placed in a temperature-controlled room. Images were taken with a 1.4 NA objective (oil immersion, 63×, Leica) with pinhole aperture set to 1 Airy Unit, pixel size of 60 nm and z-step of 200 nm. Excitation wavelength was 514 and 561 nm, and emission range was 525–540 and 570–620 nm for Venus and red fluorochromes, respectively. Laser intensity and Photomultiplier Tube (PMT) gain was set so that the image occupies the full dynamic range of the detector. Metrology measurements were regularly performed on fluorescent beads to confirm proper alignment of lasers, laser powers and field homogeneity, using MetroloJ plugin (<http://imagejdocu.tudor.lu/doku.php?id=plugin:analysis:metroloj:start>). Deconvolution with experimental PSF from fluorescent beads using Maximum Likelihood Estimation algorithm was performed with Huygens 3.7 software (Scientific Volume Imaging). 150 iterations were applied in classical mode, background intensity was averaged from the voxels with lowest intensity, and signal to noise ratio values were set to a value of 15 for Venus and 20 for DiI.

Segmentation procedure

Image segmentation and analysis were performed in ImageJ (Schneider et al. 2012). The segmentation procedure functions have been implemented in the 3D ImageJ Suite plugins (http://imagejdocu.tudor.lu/doku.php?id=plugin:stacks:3d_ij_suite:start) (Ollion et al. 2013) and automated in macros. First, local maxima are computed within a radius of 4 voxels in *xy* axis and 3 voxels in *z* axis. We determined that an intensity threshold of 5,000 was adequate to eliminate all local maxima belonging to background. The segmentation procedure is based on region growing using local maxima as seeds. First a 3D watershed is computed to specify zones dedicated to each object. In each zone, radial distribution centered on the seed is computed. For this, concentric spheres centered on local maxima define layers in which mean intensity is measured. The results are plotted and a gaussian fit is performed. The standard deviation of the gaussian curve is used to define the local threshold applied to the object. Here, the threshold used corresponds to a range of four times the value of the standard deviation, which allows a complete and precise extraction of the object. Once the local threshold is defined, the segmentation process uses the local maximum as a seed and examines the 26 neighbouring voxels; the selected voxels are then used as new centers around which neighbouring voxels are further examined. The criteria for adding voxels belonging to the objects were as following: first, voxels with intensity above the local threshold, second: voxel with intensity lower than intensity of the previously selected neighbouring voxel, third: voxels are not added individually but as block only if all neighboring voxels verify previous criteria. The second criteria prevented the selection of voxels from adjacent objects, even if watershed is primarily performed. The third criteria proved to be important to avoid filamentous extensions on extracted objects.

For dendritic spine segmentation, the software Neuronstudio (version 0.9.92) (Rodriguez et al. 2008) was used to reconstruct the dendrite and detect dendritic spines. Neuronstudio uses isodata segmentation for spines extraction, coupled to a specific layer-based voxel clustering, and reliably identifies the center of mass of the head spines. Manual correction was required for a minority of spines; in this case, the head spine center of mass was user-defined. Data generated by Neuronstudio are saved in text file format, which is imported into ImageJ. The local maximum in the vicinity of the center of mass of each head spine is found. The segmentation process described above is then performed to accurately segment spine heads. For each striatal neuron, a dendritic segment of 50–70 μm in length and distant from at least 50 μm from the soma or after the first branching point was considered. No type classification

(thin/mushroom) was used since it is not applicable to MSNs (Wilson et al. 1983).

Synapse identification and morphological analysis

Measurements were performed in the three dimensions with 3D Roi Manager from 3D ImageJ Suite. The 3D smallest border-to-border distance in between each head spine and all VGLUT1 objects is computed and the VGLUT1 objects found at a distance below a user-defined threshold are selected. Here the threshold value was set to 0, meaning that the two objects must overlap. Length of the spine was estimated by measuring the distance between the geometrical center of the head spine segmented by our method and the surface of the vertices from the dendrite model reconstructed in Neuronstudio and imported in ImageJ. Dendrite diameter was estimated as the mean diameter of the vertices calculated for each dendrite. 3D surface rendering was obtained with 3D viewer plugin.

Immunofluorescence and analysis

Brain slices were treated for 30 min with 0.1 % Triton X-100 and 3 % bovine serum albumin (BSA) in PBS. Mouse monoclonal antibody directed against synaptophysin (1/1000, SVP-38, Sigma-Aldrich) or bassoon (1/1000, SAP7F407, Stressgene) was incubated in $0.01\times$ Triton overnight at 4 °C. Sections were washed in PBS and incubated with the secondary antibody coupled to Alexa561 (anti-mouse 1/500, Invitrogen) 2 h at RT.

Western blot

Mice were killed and the brain immediately frozen in liquid nitrogen. The frozen brains were cut on a microtome until the region of interest appeared and striata were punched and stored in individual tubes at $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ until they were homogenized by sonication in a 1 % SDS (v/v) solution in water at $100\text{ }^{\circ}\text{C}$ containing 1 mM sodium orthovanadate, placed for 5 min at $100\text{ }^{\circ}\text{C}$ and stored at $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Protein concentrations were determined using the BCA protein assay kit (Pierce, Rockford, IL) and equal amounts of protein (8 μg per lane) were separated by 10 % SDS–polyacrylamide gel electrophoresis, before electrophoretic transfer onto nitrocellulose membranes (GE Healthcare, Piscataway, NJ). Membranes were blocked 1 h at RT in blocking solution (Rockland) half diluted in PBS with 1 % Tween-20. Membranes were then incubated in same blocking solution overnight at 4 °C with goat polyclonal anti-VGLUT1 (1/5000, a kind gift from Dr. El Mestikawy) and mouse monoclonal anti- β -tubulin (1/5000, Sigma Aldrich). Membranes were rinsed three times in TBS-tween and then incubated for 1 h at RT with 700 nm

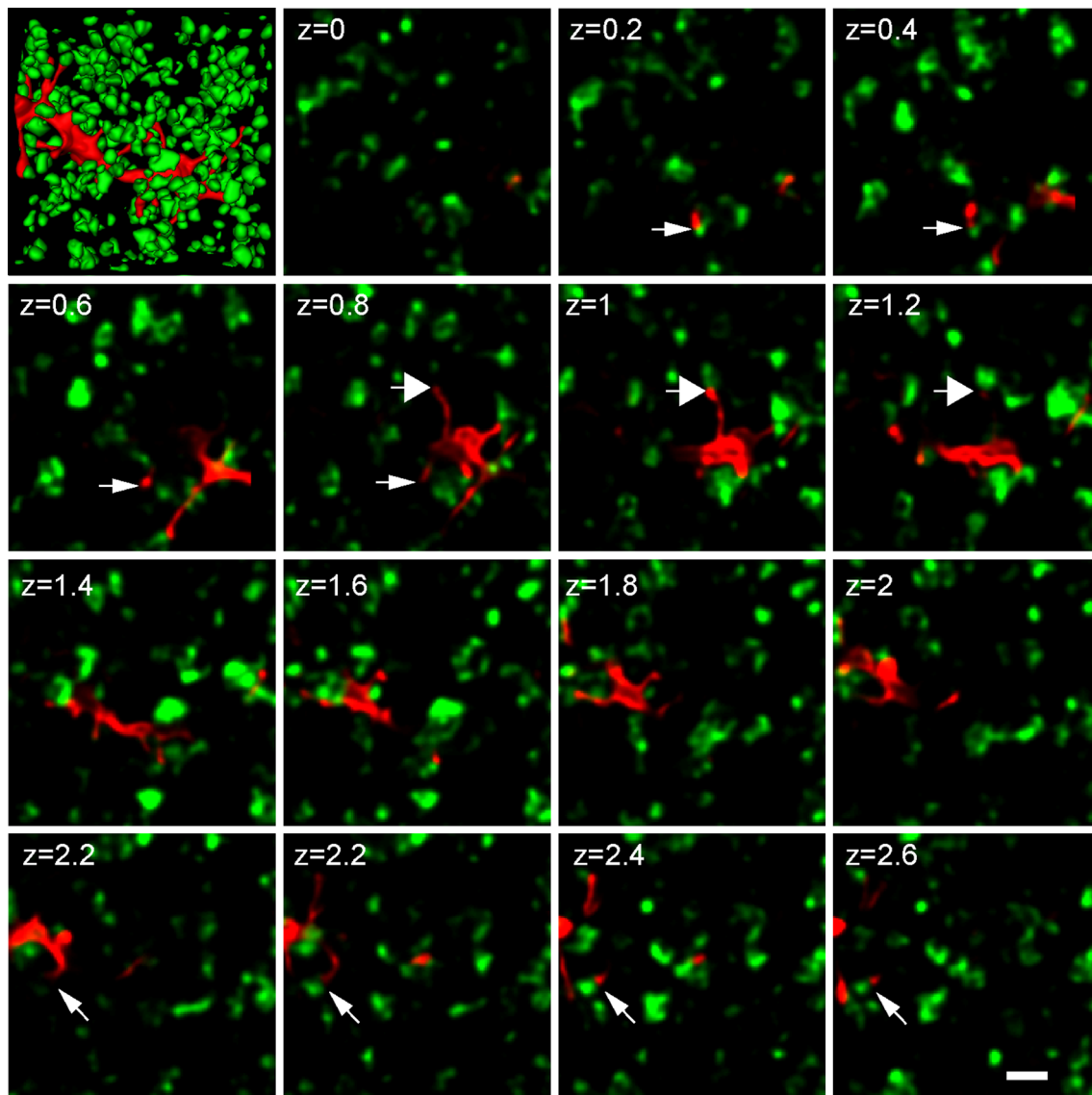


Fig. 1 Labeling of dendrite and spines in VGLUT1^{venus} mouse allows the observation of pre and post-synapses. Montage of the stack of images from confocal microscopy, which appears in 3D view at the *top left*. Each image is separated by a z -step of 0.2 μm . *Arrows*

indicate examples of VGLUT1-positive boutons in contact with dendritic spines of a medium spiny neuron from the ventral striatum. *Scale bar* 1 μm

fluorochrome coupled anti-goat (1/5000, Rockland) and 800 nm fluorochrome-coupled anti-mouse (1/5000, Rockland) antibodies and immunoreactive bands were visualized with Odyssey scanner (Li-Cor). The densitometry of the relevant immunoreactive bands was quantified using ImageJ and normalized to the intensity of the corresponding tubulin signal, which serves as a loading control.

Cocaine treatment

Locomotor activity was measured using rectangular activity boxes (20 × 15 × 25 cm) (Immetronic) located in a soundproof testing room with low luminosity. Locomotor

activity was counted as travels detected by interruption of photocell beams located across the long axis 15 mm above the floor. Each box was connected to an electronic interface for data collection. Locomotor sensitization was evaluated as a recording of locomotor activity 30 min before and 30 min after the saline or cocaine injection. Mice were treated with saline and placed in the activity box for 60 min during 3 consecutive days for habituation before the actual experiments were performed. Mice were then repeatedly treated with saline or cocaine (20 mg/kg, i.p., every day) for 5 consecutive days, and killed on the 6th day for morphological analysis. Cocaine hydrochloride (Sigma-Aldrich) was dissolved in a 0.9 % NaCl (w/v) aqueous solution (saline).

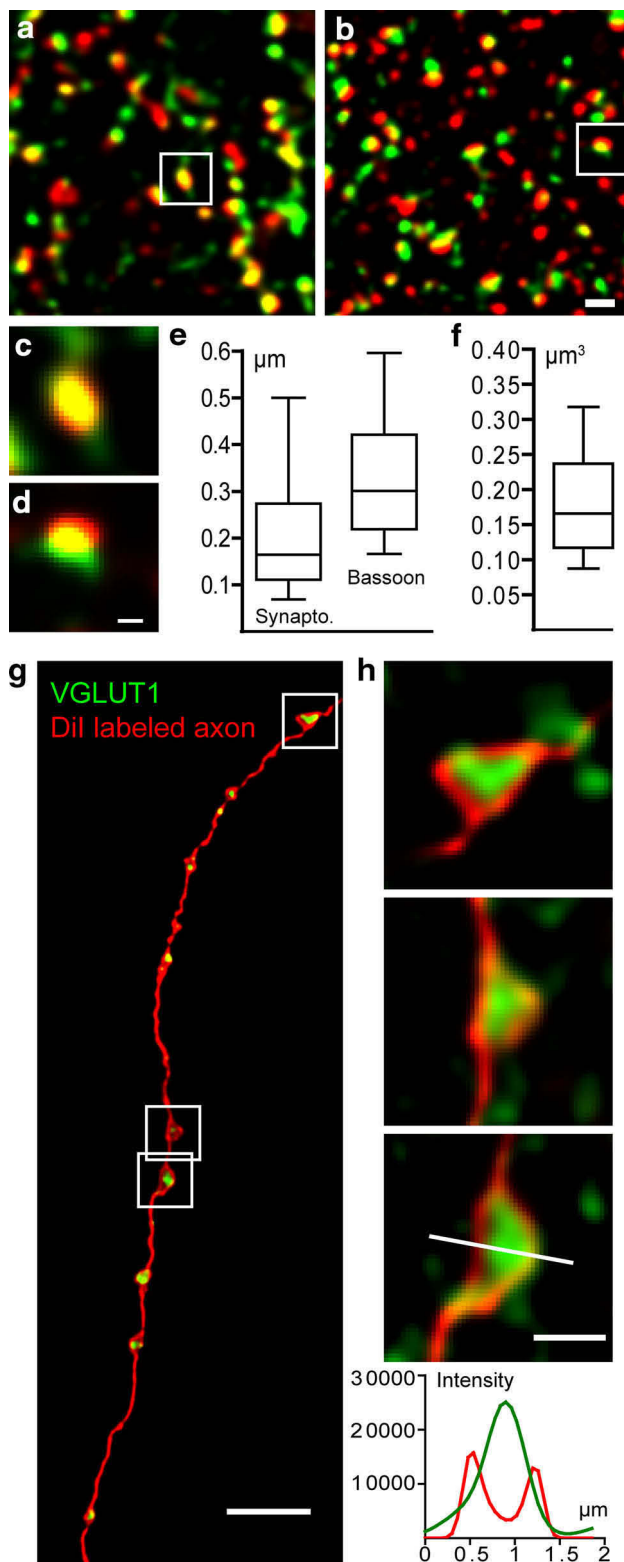


Fig. 2 VGLUT1 objects are presynaptic elements. Immunostaining for (a) synaptophysin (red) or (b) bassoon (red) in ventral striatum from VGLUT1^{venus} (green) mice shows extensive colocalization. c, d Close-up from (a) and (b) confirms that synaptophysin (a) and bassoon (b) colocalize with VGLUT1^{venus} objects. a–d Single planes from the 3D confocal image. e 3D measurements of the distance between the centers of the objects confirm observations shown in (c) and (d). Center to center distance between synaptophysin and VGLUT1 is lower than microscope resolution, indicating perfect colocalization ($n = 988$ distances from 3 mice, median = 0.164 μm). Center to center distance between bassoon and VGLUT1 is higher, since bassoon is localized in the active zone ($n = 1,045$ distances from 3 mice, median = 0.301 μm). f 3D measurements of volumes from segmented VGLUT1^{venus} objects ($n = 2,175$ objects from 4 mice, median = 0.166 μm³). g DiI-labeled axon (red) was traced with neuronstudio software and VGLUT1 objects (green) colocalizing with the axon were detected. The image is the maximum intensity projection from the 3D confocal image containing the traced axon and the colocalizing VGLUT1 objects. h Close-ups from (g). The line profile plot gives intensities measurements along the line in both DiI and Venus channels for a single plane from 3D confocal image. The graphic highlights the plasma membrane localization of the lipophilic DiI and the localization of Venus signal within the axonal bouton. Scale bars a, b, h = 1 μm; c, d = 300 nm; g = 5 μm

10–90 percentiles. Student's *t* test, Mann–Whitney test or analysis of variance was used. Significance was set at $p < 0.05$.

Results

A new 3D automated method allows the morphological analysis of dendritic spines and VGLUT1-positive pre-synapses

We aimed at determining whether spine growth upon cocaine treatment corresponds to an increase in cortico-striatal connectivity. To this end, we developed a method to visualize dendritic spines connected to cortical boutons and analyze the synaptic contacts. Neurons were labeled with DiI in VGLUT1^{venus} knock-in mice. These mice express the Vesicular GLUamate Transporter 1 (VGLUT1), fused to the fluorescent protein Venus under VGLUT1 endogenous promoter (Herzog et al. 2011). VGLUT1 is a trans-membrane protein of the presynaptic vesicles that uptake glutamate into vesicles. Hence all glutamatergic, VGLUT1 positive, boutons can be observed at any depth of the tissue. Moreover, the high brightness of Venus ensures proper imaging without need for enhancement by antibodies (Shaner et al. 2005). Hence, diolistic labeling of individual neurons with red DiI allows the observation of dendrites bearing spines within a tissue volume where all VGLUT1-positive presynapses can be seen (Fig. 1).

The fusion protein VGLUT1^{venus} is replacing VGLUT1 through homologous recombination at the endogenous *vglut1* locus. VGLUT1^{venus} expression and function are

Statistical analysis

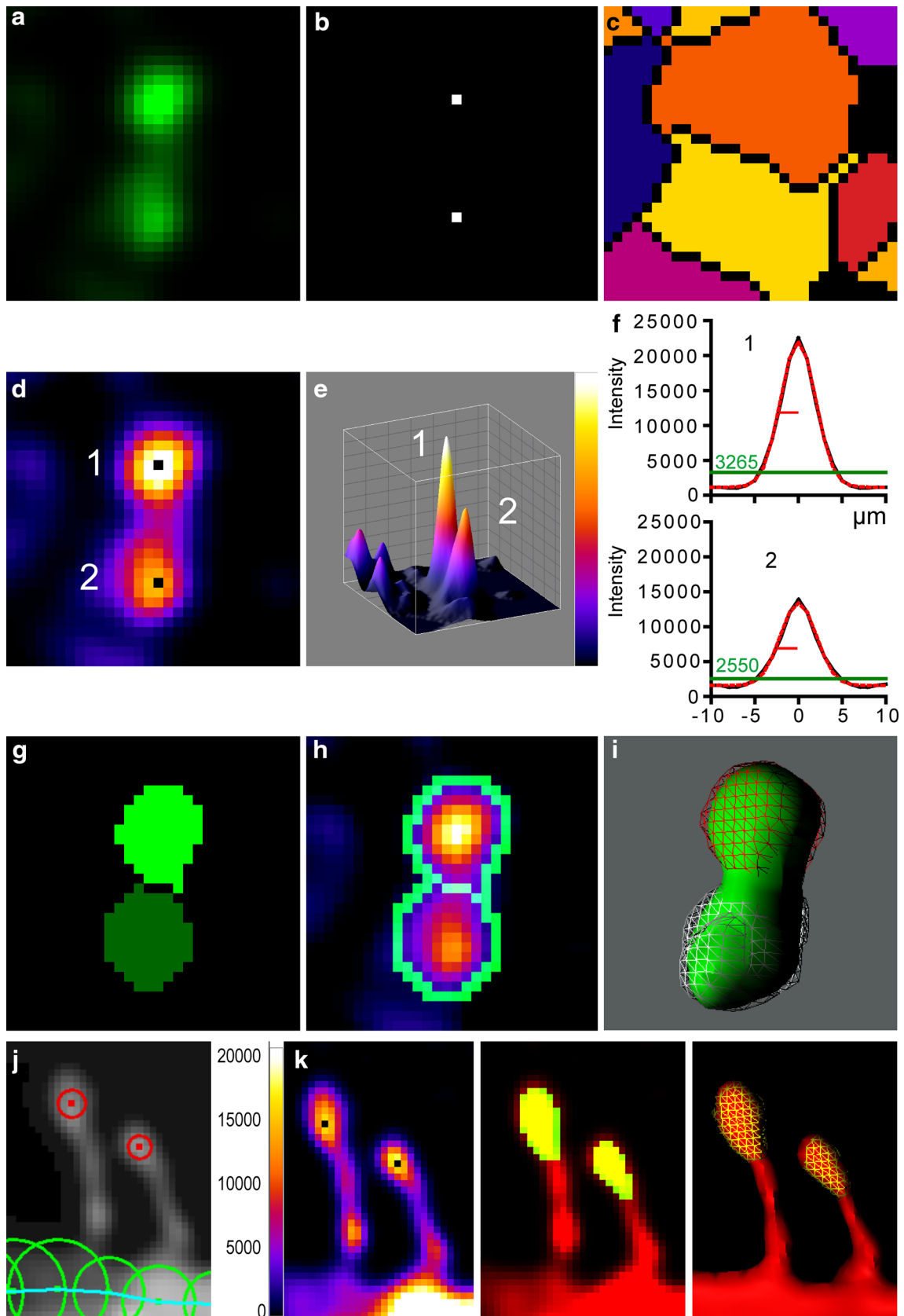
Data generated were imported in GraphPad Prism for statistical analysis. Values and histograms are mean ± SEM. Box plots display median, interquartile distances and

perfectly matching those of the wild-type littermates (Herzog et al. 2011). Since our method relies on the observation of the presynapses in knock-in mice, we further characterized the identity of the VGLUT1^{venus} objects in the striatum. The identity of the VGLUT1 objects was confirmed by immunostaining directed against pre-synaptic markers. Immunostaining for both synaptophysin and bassoon in slices from VGLUT1^{venus} mice showed extensive colocalization (Fig. 2a, b). 72 % ($n = 500$ synaptophysin-positive out of 694 VGLUT1 objects from 3 mice) and 82 % ($n = 1,619$ bassoon-positive out of 1970 VGLUT1 objects from 3 mice) of VGLUT1 objects were found to be synaptophysin-positive and bassoon-positive, respectively. Complete objects colocalization percentage was not found since immunostaining cannot ensure the labeling of all elements, leading to highly variable number of false negatives. Synaptophysin is localized in the synaptic vesicle membrane, while bassoon is found in the active zone that is facing the postsynaptic density. Observations (Fig. 2c, d) and measurements (Fig. 2e) were in accordance with these subcellular localizations. Center to center distance from VGLUT1 objects to synaptophysin objects was below spatial resolution of the optical system, which indicates a perfect colocalization. A shift corresponding to the gap between the synaptic vesicle cluster and the active zone centers was observed between bassoon- and VGLUT1^{venus}-positive objects. Moreover, the size of VGLUT1 objects after segmentation (Fig. 2f) is consistent with the size reported in studies conducted with serial electron microscopy (Doig et al. 2010). The diolistic labeling allowed for the observation of axons, although axonal labeling is a rarer event than dendritic labeling. When cortical axons were labeled, the VGLUT1^{venus} signal was located within varicosities of the axon (Fig. 2g, h), which further confirmed that VGLUT1 objects correspond to axonal boutons.

To obtain a precise three-dimensional analysis of synaptic contacts, we set up an automated method for pre and postsynapses segmentation followed by detection of contacts. Since VGLUT1 pre-synaptic elements vary in size and intensity, classical intensity thresholding was not effective (Meijering 2012). Hence a segmentation workflow was established, which allows for the detection of all objects and precise identification of voxels belonging to each object (Fig. 3a–i and see “Methods” section). Object shape is extracted in 3D by exploring the intensity levels around the local maximum to determine a local threshold specific to each object, and then the voxels belonging to the objects are iteratively selected according to criteria that ensure separation of adjacent objects and faithfully delineate objects shape. Dendritic spines detection was performed with Neuronstudio software (Fig. 3j), and the coordinates of the center of mass of each spine head were

Fig. 3 Automated 3D segmentation of VGLUT1 objects and head spines. The method for segmentation is illustrated with one single plane from 3D image stack, but all algorithms used work in 3D. **a** Original single plane from 3D confocal image showing two adjacent VGLUT1 objects. **b** Voxels corresponding to intensity local maxima are identified in each object. **c** Watershed algorithm defines zones in the image. Each zone contains one object. **d** Local maxima are shown on the original image (*black voxel*). False colors in the original image indicate voxels intensities. **e** Surface plot quantifying the voxel intensities in the single confocal plane to illustrate the difference in intensity of the objects. Hence, a specific threshold value needs to be determined for each object to reliably segment them. **f** To determine local threshold specific to each object, 3D radial distribution of voxel mean intensities measured between concentric spheres centered on the local maximum is computed. The results for the two VGLUT1 objects are plotted (*black line*). A gauss curve is fitted on the plot (*red dotted line*) and the standard deviation computed (*red horizontal line*). The intensity threshold (*green horizontal line*) is defined for the gauss curve level in which width is four times the standard deviation value. This procedure allows the determination of a specific threshold for each object (*green values*). **g** Starting from local maximum, voxels belonging to the object are iteratively identified. The criteria used are described in “Methods” section and include local threshold value as defined in (f). This procedure allows the accurate extraction of objects despite their difference in intensity. **h** Original image in false colors with *green outlines* that show the outer border of the segmented objects. Note that the algorithm of object extraction allows an accurate separation of both objects. **i** 3D view of the original objects (*green*) and mesh surface rendering of the segmented objects (*red, white*). **j** Original single plane from confocal 3D image showing two dendritic spines. Neuronstudio software allows the modeling of the dendritic path as a series of vertices (*green circles*), detection of spines (*red circles*) and identification of the center of mass of head spines (*red dots in circles*). **k** The localization of the local maximum in the neighborhood of the head spines center of mass is computed. Local maximum are shown on the original image (*black voxel*). False colors in the original image indicate voxels intensities. Starting from the local maximum, the segmentation algorithm reliably identifies the voxels belonging to the head spine. 3D view confirms that segmented head spines fit the 3D original image

imported in ImageJ. Local maximum in the vicinity of the center of mass was identified, and segmentation was then carried out according to the same procedure as for VGLUT1 objects (Fig. 3k). The result of our segmentation protocol is a precise extraction of the head of the spines. This method allowed the automated segmentation of all VGLUT1 axonal boutons (Fig. 4b) and head spines (Fig. 4c) from confocal images despite the high density of objects (Fig. 4a), which renders manual detection unachievable. After segmentation, the border-to-border distance between each head spines and each VGLUT1 objects is computed and pairs of pre and post-synapses are identified when the distance is below a user-defined threshold. Here we considered synapses when there was no gap between VGLUT1 and head spines (Wouterlood et al. 2007). An image is then generated, which contains the selected VGLUT1s and spine heads along with the dendritic path (Fig. 4d). Beside the image, 3D quantitative morphological information is computed on each object.



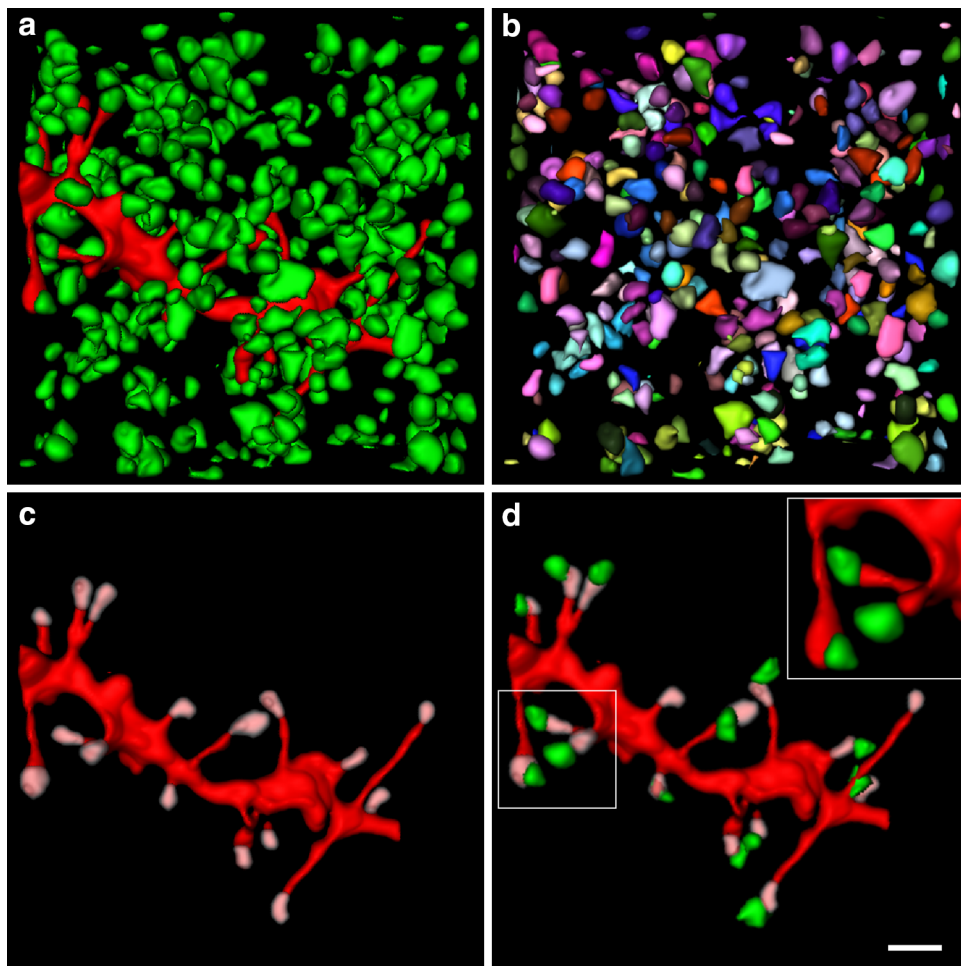


Fig. 4 3D detection and morphological analysis of contacted axonal boutons and dendritic head spines. **a** 3D rendering of a *close-up* from confocal microscopy images showing a striatal dendritic segment with spines labeled by DiI (*red*) within VGLUT1^{venus} (*green*). All VGLUT1-positive presynapses can be observed. Some presynaptic elements are seen in contact with dendritic spines. **b** Each VGLUT1 presynapse from the tissue volume is segmented and identified through our custom segmentation workflow. A *different color* has been attributed to each object. **c** The heads of every dendritic spine

are detected and accurately segmented. The result (*pink*) is shown merged with the original image (*red*). **d** The smallest border-to-border distances between each head spine and VGLUT1 presynapse are computed, and associated pre and postsynaptic elements are detected. An image including the dendrite and the associated presynapse is generated. The *close-up* illustrates the position for VGLUT1 presynapses on the head of the spines. Not all spines are connected since MSNs are also innervated by VGLUT2-positive thalamic afferents. Scale bar 1 μ m

Observation of synaptic contacts on striatal neurons and comparison to hippocampal pyramidal and cerebellar Purkinje cells

MSNs receive afferences from VGLUT1-positive neurons of the neocortex and from VGLUT2-positive neurons of the thalamus. It should however be mentioned that neurons from basolateral nucleus of the amygdala as well as from the hippocampus express VGLUT1 and project to the striatum (Herzog et al. 2001; Freneau et al. 2001; Britt et al. 2012; MacAskill et al. 2012). Nevertheless, the afferents from neocortex represent the vast majority of VGLUT1 inputs on MSNs (Groenewegen et al. 1999). On the other hand, glutamatergic neurons from thalamus projecting to

the striatum exclusively express VGLUT2 (Freneau et al. 2004), and as such are excluded from our study. Finally, the VGLUT1 boutons form synapses exclusively on heads of dendritic spines of the MSNs (Doig et al. 2010; Huerta-Ocampo et al. 2013). Altogether, the results brought by our automated method, which identifies VGLUT1-positive synaptic contacts on the heads of half of the dendritic spines (Fig. 4d), correspond to those expected from the literature.

As a matter of fact, the percentage of spines connected with VGLUT1 objects was $54 \% \pm 1.6$, which fits exactly with the data from serial electron microscopy (Fig. 5a) (Doig et al. 2010; Huerta-Ocampo et al. 2013), where half of the spines contact VGLUT1-positive cortical presynapses, while the other half contacts VGLUT2-positive

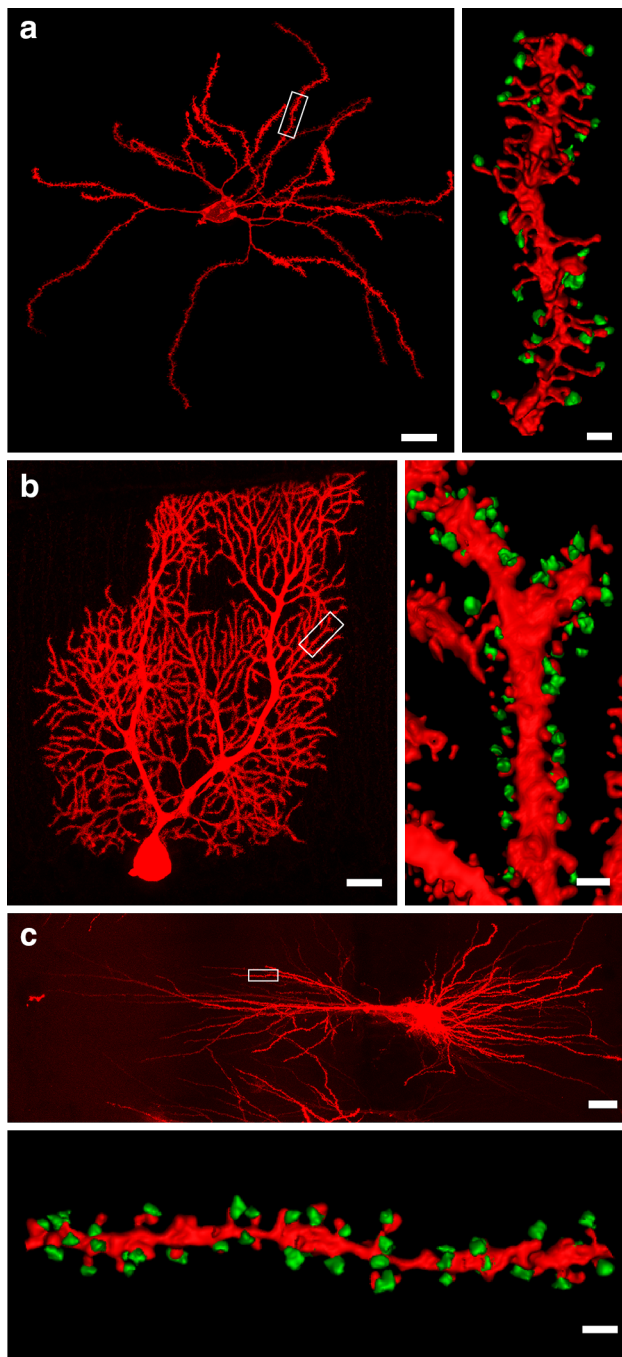


Fig. 5 The percentage of dendritic spines connected with VGLUT1 objects is in accordance with neuroanatomical studies and confirms the specificity of the automated 3D detection. **a** Medium spiny neuron (MSN) from dorsomedial striatum labeled with diolistic method. *Close-up* shows a dendritic segment with the VGLUT1 presynapses (green) connected to the dendritic spines (red). The 3D automated detection reveals that about half the spines are in contact with VGLUT1 boutons. **b** Purkinje cell from the cerebellum stained by intracellular filling in slice. *Close-up* shows a dendritic segment with the VGLUT1 presynapses connected to the dendritic spines. **c** Pyramidal neuron from the CA1 region of the hippocampus labeled with the diolistic method. *Close-up* shows a dendritic segment with the VGLUT1 presynapses connected to the dendritic spines. For both pyramidal neuron and Purkinje cell, all dendritic spines are contacted by a VGLUT1 bouton. Scale bar 20 μ m

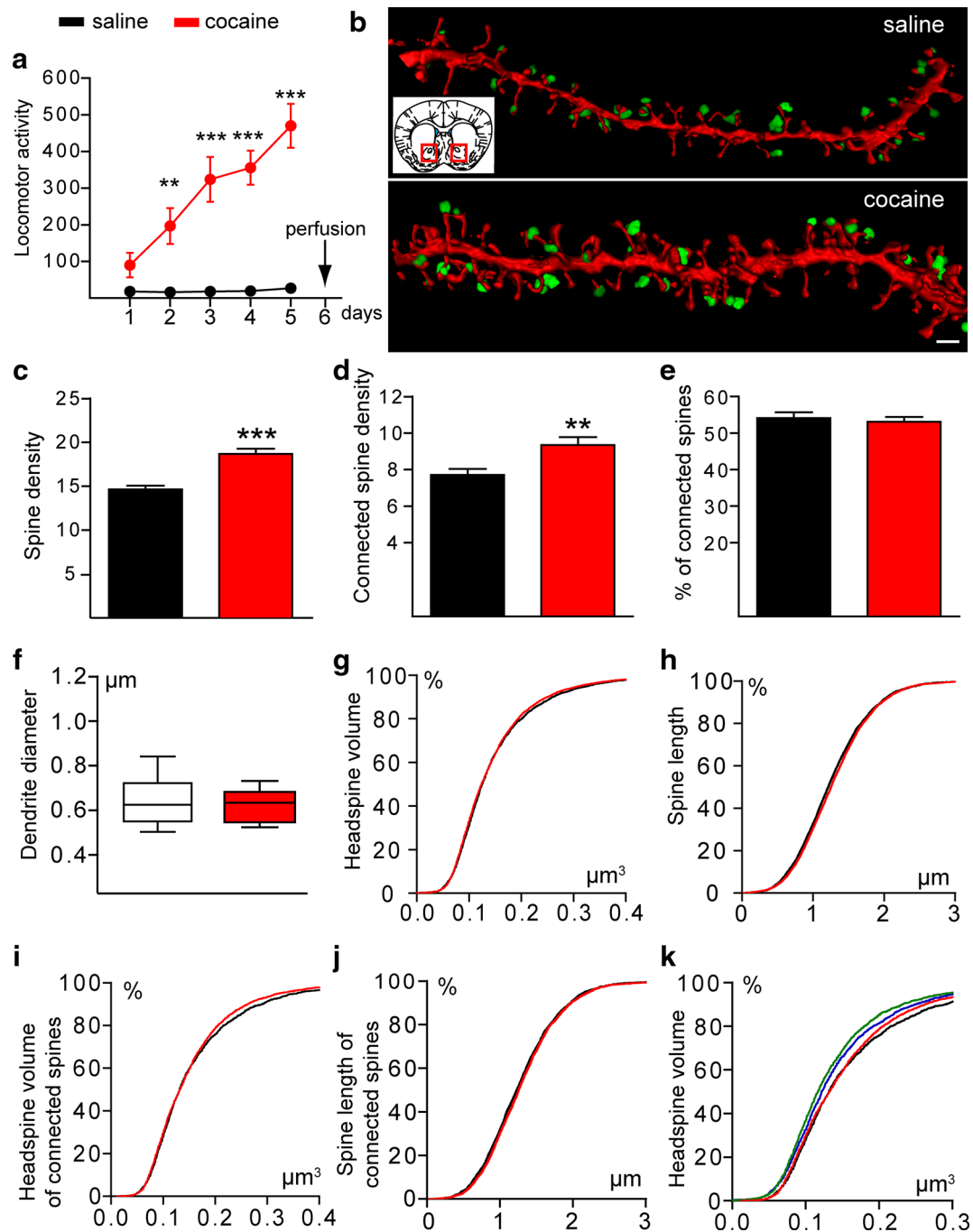
anatomy of the VGLUT1 afferences on these neuronal types.

Cocaine-induced locomotor sensitization is associated with corticostriatal synapse formation

We then applied this 3D automated method to DiI-labeled MSN from VGLUT1^{venus} mice chronically treated or not with cocaine. To characterize a potential increase of cortico-striatal connectivity by cocaine, we injected VGLUT1^{venus} mice daily with a fixed dose of cocaine for 5 days, or saline as negative controls, a procedure that induces a long-lasting behavioral adaptation to cocaine called locomotor sensitization (Fig. 6a). Synapses of MSNs from nucleus accumbens in the core region were then analyzed on striatal sections on the 6th day, therefore corresponding to a withdrawal period of 24 h (Fig. 6b).

Our 3D automated method allowed the analysis of 5,978 synaptic contacts among 11,222 observed spines. In accordance with previous studies (Robinson and Kolb 1999; Shen et al. 2009; Dumitriu et al. 2012; Alcantara et al. 2011), an increase in spine density was observed (Fig. 6c). Furthermore, an increase in cortico-striatal connections was measured as well (Fig. 6d), which confirmed that new cortico-striatal synapses were generated by repeated cocaine administration. Importantly, the percentage of spines connected to VGLUT1 remained constant between saline and cocaine conditions (Fig. 6e), indicating that the stoichiometry of the two main inputs onto MSN, which originate from the cortex and thalamus, is preserved when connectivity increases upon cocaine administration. Further analysis showed that dendrite diameter, spines volumes and length after cocaine treatment were similar to controls (Fig. 6f–j). Analysis of spine length distribution showed that there were no filopodia, suggesting that the new spines were mature (Fig. 6h, j). In addition, dendritic spines connected to cortical VGLUT1 presynapses were larger than others in both saline and cocaine conditions (Fig. 6k).

thalamic afferences. To further confirm the specificity of the association of VGLUT1 boutons with spine heads, the method was applied on other cell types for which the awaited percentage is closer to 100 %. Analysis of biocytin-filled Purkinje cell from the cerebellum (Fig. 5b) and diolistically labeled pyramidal neuron from CA1 region of the hippocampus (Fig. 5c) retrieved the percentage of spines in contact with VGLUT1 objects as $95.9 \% \pm 1.2$ and $90.9 \% \pm 2.7$, respectively. These results argue for the specificity of our automated method, since such percentages are in agreement with the current knowledge on the



We measured VGLUT1 objects density and VGLUT1 protein expression level in the nucleus accumbens from mice exposed to chronic cocaine injections. The density in the tissue remained constant (Fig. 7a). Moreover, the expression level of VGLUT1 protein measured by Western blot remained unchanged (Fig. 7b). Altogether, these results indicate that new spines contact pre-existing presynaptic elements. If this were to be the case, the occurrence of VGLUT1 objects in connection with two spines, which has been reported in electron microscopy studies (Doig et al. 2010), should be higher on

dendrites from cocaine-treated animals. In agreement with this hypothesis, the percentage of spines in contact with a common VGLUT1 was indeed increased in cocaine-treated groups for both experiments (Fig. 7c). It is likely that the frequency of those events is underestimated; since a single neuron was labeled, it was not possible to detect if presynapses also contacted spines of a dendrite from neighbouring neuron. Taken together, these results support a model in which the new spines establish contacts with axonal boutons that are already in place (Fig. 7d).

Fig. 6 Chronic cocaine induces cortico-striatal synapses formation by contact of new spines on pre-existing VGLUT1 boutons. **a** Locomotor sensitization upon repeated administration cocaine (20 mg/kg) in VGLUT1^{venus} mice. Note the progressive increase in locomotor activity upon repeated injection of the same dose of cocaine. **b** The formation of new cortico-striatal connections was assessed on day 6 at the end of this paradigm of locomotor sensitization. Dendritic segments (*red*) from saline (*upper panel*) and cocaine (*lower panel*) treated mice, with the VGLUT1 boutons (*green*) connected to the dendritic spines of MSNs from the core of the nucleus accumbens. **c** Spine density was measured using the automated detection and showed an increase in cocaine-treated mice when compared with saline (*t* test $p < 0.0001$). **d** The density of spines connected to VGLUT1 presynapses is increased in cocaine compared to saline treated mice (*t* test $p = 0.0038$). **e** The percentage of spines connected to a VGLUT1 bouton is similar between saline- and cocaine-treated mice (*t* test $p = 0.6284$). **f** Dendritic diameter is similar in saline- and cocaine-treated mice (Mann–Whitney $p = 0.5691$). **g** Head spine volumes from all dendritic spines from saline- and cocaine-treated mice are similar (Mann–Whitney $p = 0.0967$). **h** Spine length from all dendritic spines from saline- and cocaine-treated mice is similar (Mann–Whitney $p = 0.0012$, but median difference is 40 nm, which is lower than resolution limit of the optical system). **i** Head spine volumes from dendritic spines connected to VGLUT1 boutons from saline- and cocaine-treated mice are similar (Mann–Whitney $p = 0.1210$). **j** Spine length from dendritic spines connected to VGLUT1 boutons from saline- and cocaine-treated mice is similar (Mann–Whitney $p = 0.0522$). **k** Volumes of cortico-striatal head spines contacted by VGLUT1 boutons (*black saline, red cocaine*) have bigger volumes than other head spines (*blue saline, green cocaine*) in both saline ($p < 0.001$) and cocaine ($p < 0.001$) conditions (non parametric ANOVA followed by Dunn's test). Analysis performed on $N = 5,978$ synapses of 11,222 spines of 114 neurons from 12 mice. Scale bar 2 μm

Discussion

A new versatile method for the detection and morphological study of VGLUT1-positive synapses

We established a new method for 3D automated morphological analysis of connected glutamatergic pre and postsynaptic elements. Since VGLUT1-positive presynapses are specifically labeled, a defined set of glutamatergic synapses can be analyzed. One strength of our method is that the knock-in strategy enables the labeling of all VGLUT1 presynapses at all depth in the tissue. This is essential because imaging dendrites often imply to image over consequent depth in the tissue, which is the case for MSNs in which dendritic tree occupies large volume (van Dongen et al. 2008). Moreover, labeling of postsynaptic neuron can be achieved by any method (e.g. diolistic, intracellular filling, transfection). Hence technical requirements for labeling are easy to meet, and the method can be applied to various neuronal types from different brain regions.

It is noteworthy that our method is by no mean an application of Peter's rule, which proposes to localize synapses based on axon-dendrite proximity (Stepanyants and Chklovskii 2005). Peter's rule does not retrieve reliable results

(Mishchenko et al. 2010) and specific labeling is required for proper detection of synapses (Wickersham and Feinberg 2012). This is achieved by our approach that accurately detects contacts between identified presynaptic elements and the heads of dendritic spines. Since all VGLUT1 presynapses are labeled with the knock-in strategy, the ones connected to the dendritic spines need to be properly selected. The percentage of connections that we found on the different neuronal types was found to match with that of electron microscopy studies, which brings confirmation of the reliability of the association of pre and postsynaptic elements automatically performed by our method.

To our knowledge there is no other method that allows the morphological analysis of both pre and postsynaptic elements along the whole dendritic path in vivo. Previous attempts were made to study dynamics of pre and postsynaptic structures by intracellular filling of connected neurons, but restricted the experiment to slices, while very sparse colabeling of connections was obtained (Becker et al. 2008). Immunolabeling of the presynaptic elements combined with postsynaptic neuronal labeling has been used (Spiga et al. 2011; Rotterman et al. 2014), but one important drawback of this technique is that it may have a high rate of false positive, since antibody penetration can be a limiting factor while the use of thick sections is required to image whole dendrites. Recently, in vivo viral transfection in the thalamus allowed the observation of thalamic axonal boutons on spines of cortical neurons (Schoonover et al. 2014). However, it is difficult to estimate whether viral transfection ensures the labeling of all synapses along one dendrite. Tracing with modified rabies viruses permits the labeling of pre and postsynaptic neurons but an in-depth analysis of pre and post synapses has never been achieved with this method (Wickersham et al. 2013). Another approach called GRASP has been developed for the detection of synapses (Kim et al. 2011), in which truncated green fluorescent protein in fusion with pre and postsynaptic proteins acquires fluorescence when both proteins interact. However, fluorescent spots indicate synapses without any information about their morphology. Recently, a viral-based method allowed for labeling of axons and postsynaptic neurons in *Drosophila* (Chen et al. 2014); the extension of this method to rodents remains to be developed. These methods are complementary to ours, but require careful in vivo viral transfections. In the case of the GRASP method, cotransfection should be carefully avoided. It is noteworthy that if those methods would be improved so pre and postsynaptic labeling would be achieved, our automated method for the segmentation and detection of synaptic contacts could be applied and would allow complete 3D analysis. The only method allowing complete morphological analysis of synapses is electron microscopy, but it restricts the observation to small

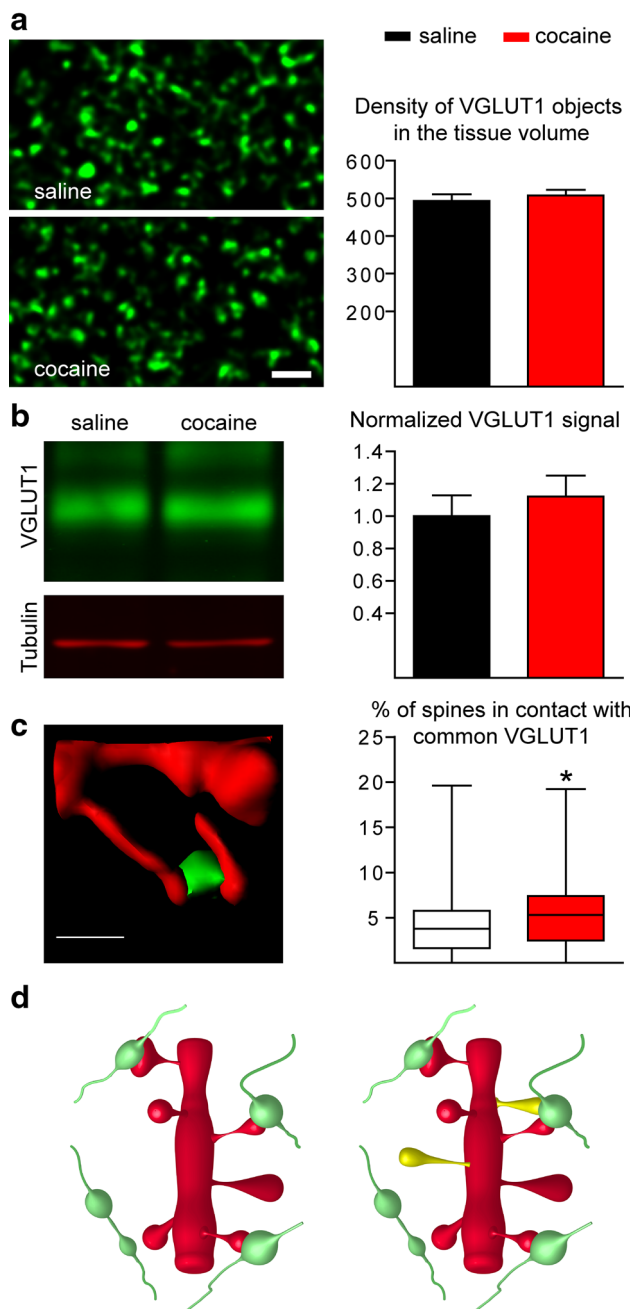


Fig. 7 Mode of formation of synapses. **a** Single planes from the 3D confocal images of VGLUT1^{venus}. *Graphic* shows the density of VGLUT1 objects. Numbers of VGLUT1 objects were counted in 3D images and normalized so the density is the number of objects in a square of 10 μ m side. The density of VGLUT1 objects in the tissue volume is similar in both saline- and cocaine-treated mice (*t* test $p = 0.5597$). **b** Western blot analysis shows that the protein expression level of VGLUT1 is similar in both saline- and cocaine-treated groups. *Graphic* shows quantifications of the density of VGLUT1-positive bands normalized to tubulin ($n = 6$ independent lanes from 6 mice, *t* test $p = 0.5257$). **c** Some VGLUT1 presynapses were found to be connected with two dendritic spines. The percentage of spines associated with a multi-connected VGLUT1 presynapse is increased upon cocaine treatment (Mann–Whitney test $p = 0.0388$). **d** The model of cortico-striatal synapses formation induced by repeated exposure to cocaine (see main text for details). *Left panel* before cocaine, *right panel* after cocaine. New spines are noted in yellow. Scale bar 2 μ m. Analysis performed on $n = 5,978$ synapses of 11,222 spines of 114 neurons from 12 mice

portions of dendrite unless performed on very specific serial electron microscopes (Helmstaedter et al. 2008).

In conclusion, our method allows detailed 3D morphological analysis on thousands of synapses, ensuring large-scale and high sampling analysis, while being easily applicable to various neuronal types.

Formation of cortico-striatal synapses under cocaine-induced locomotor sensitization

Since the pioneer study from Robinson and Kolb (1999), it is known that psychostimulants administration leads to an

increase in spine density on MSNs in the ventral striatum. This increase has been documented for several cocaine administration protocols (Shen et al. 2009; Dumitriu et al. 2012). However critical questions remain, and whether the increase of spine density corresponds to an enhancement of connectivity has so far been left aside, with the exception of one electron microscopy study that showed a global increase of not identified synapses (Alcantara et al. 2011). Here, we bring evidence that not only spine density but also the density of cortico-striatal synapses is increased 24 h after a chronic cocaine treatment that induces locomotor sensitization. The analysis of head spines volumes and spine lengths shows that the newly formed spines have mature morphologies and are associated with VGLUT1-positive axonal boutons. Recent studies have shown that behavioural adaptation induced by cocaine relies on long-term plasticity at synapses formed by neurons of the prefrontal cortex and the ventral hippocampus projecting onto MSNs from nucleus accumbens (Pascoli et al. 2011, 2014; Britt et al. 2012). Occlusion of plasticity at cortico-striatal and hippocampo-striatal synapses, with optogenetic tools, abolishes the behavioural output induced by cocaine. The increase in density of VGLUT1 synaptic contacts that we observed indicates an increase of connections of MSNs, which could be part of the mechanism of the synaptic plasticity implied. Nevertheless, metaplasticity has to be considered, especially the synaptic content of glutamate receptors subtypes, since chronic cocaine induces the generation of silent synapses (Huang et al. 2009; Lee and Dong 2011).

Another important result arising from our analysis is that the stoichiometry of the two main inputs on MSNs is preserved when connectivity increases upon cocaine administration. Indeed, the percentage of dendritic spines connected to VGLUT1 presynapses was similar in both saline and cocaine conditions. Hence, in both naïve and

cocaine-treated mice, half of the head spines receive VGLUT1-positive cortical afferents while the other half receives VGLUT2-containing thalamic afferents (Doig et al. 2010). This implies that VGLUT2-containing thalamic afferents increase their synaptic connections on MSNs under cocaine similarly to the VGLUT1-positive cortical and hippocampal afferents.

Mode of synapse formation

Two models have been proposed to explain the mode of synapse formation in the adult brain (Holtmaat and Svoboda 2009). On the one hand, the growing spine could instruct the formation of a new presynaptic element from the axon; on the other hand, the newly formed spines could contact already existing presynaptic elements. If the first model were to be right, an increase in VGLUT1 objects density would have been observed along with the spine density increase. Our data are not compatible with the first model and support the second one (Fig. 7d). Moreover, the occurrence of multiple spines connecting a common VGLUT1-positive presynapse was higher under cocaine treatment. It is likely that the frequency of those events is underestimated, since a single dendrite was labeled; thus, it was not possible to identify presynapses contacted by spines from adjacent dendrites. However, the increase in percentage of spines converging to a common presynapse brings strong support to the second model of synapse formation. So far, only one in vivo study directly analyzed the mode of synapse formation in the adult mouse brain. Correlative electron microscopy following fluorescent microscopy of spines from somatosensory cortex allowed Knott et al. (2006) to observe that new spines contact presynaptic elements connected to another spine, thus concluding to a similar mode of synapse formation. Such a mechanism would favor synchronization, which is critical for the integration of cortical inputs by MSNs leading to firing (Mahon et al. 2007).

Taken together, our results show that new cortico-striatal synapses are generated in correlation with locomotor sensitization induced by cocaine. Furthermore, the mode of synapse formation seems to correspond to a spine growth leading to contact and stabilization with pre-existing axonal boutons. We propose that our data showing formation of new cortico-striatal connections in response to chronic cocaine should be considered in the design of therapeutic approaches in addiction.

Acknowledgments This work was supported by Centre National pour la Recherche Scientifique (CNRS), Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM), University Pierre and Marie Curie (UPMC), Agence Nationale pour la Recherche (ANR, ANR-08-BLAN-0287) and Fondation Jérôme Lejeune and the Labex Bio-Psy cluster of excellence. We wish to thank Dr. Susanne Bolte and

Richard Schwartzmann from the Cellular Imaging facility of the IBPS (Institut de Biologie Paris-Seine) for expert assistance on microscopy and metrological analysis of the setup. We thank Dr. Kätlin Slim the care of the VGLUT1^{venus} mouse line and Dr. Ann Lohof for intracellular filling of Purkinje cells.

Conflict of interest The authors declare no competing financial interests.

References

- Alcantara AA, Lim HY, Floyd CE, Garces J, Mendenhall JM, Lyons CL, Berlanga ML (2011) Cocaine- and morphine-induced synaptic plasticity in the nucleus accumbens. *Synapse* 65(4):309–320
- Becker N, Wierenga CJ, Fonseca R, Bonhoeffer T, Nägerl UV (2008) LTD induction causes morphological changes of presynaptic boutons and reduces their contacts with spines. *Neuron* 60(4):590–597
- Britt JP, Benaliouad F, McDevitt RA, Stuber GD, Wise RA, Bonci A (2012) Synaptic and behavioral profile of multiple glutamatergic inputs to the nucleus accumbens. *Neuron* 76(4):790–803
- Chen Y, Akin O, Nern A, Tsui CY, Pecot MY, Zipursky SL (2014) Cell-type-specific labeling of synapses in vivo through synaptic tagging with recombination. *Neuron* 81(2):280–293
- DeFelipe J (2010) From the connectome to the synaptome: an epic love story. *Science* 330(6008):1198–1201
- Doig NM, Moss J, Bolam JP (2010) Cortical and thalamic innervation of direct and indirect pathway medium-sized spiny neurons in mouse striatum. *J Neurosci* 30(44):14610–14618
- Dumitriu D, Laplant Q, Grossman YS, Dias C, Janssen WG, Russo SJ, Morrison JH, Nestler EJ (2012) Subregional, dendritic compartment, and spine subtype specificity in cocaine regulation of dendritic spines in the nucleus accumbens. *J Neurosci* 32(20):6957–6966
- Freneau RT Jr, Troyer MD, Pahner I, Nygaard GO, Tran CH, Reimer RJ, Bellocchio EE, Fortin D, Storm-Mathisen J, Edwards RH (2001) The expression of vesicular glutamate transporters defines two classes of excitatory synapse. *Neuron* 31(2):247–260
- Freneau RT Jr, Voglmaier S, Seal RP, Edwards RH (2004) VGLUTs define subsets of excitatory neurons and suggest novel roles for glutamate. *Trends Neurosci* 27(2):98–103
- Gan WB, Grutzendler J, Wong WT, Wong RO, Lichtman JW (2000) Multicolor “Diolistic” labeling of the nervous system using lipophilic dye combinations. *Neuron* 27(2):219–225
- Groenewegen HJ, Wright CI, Beijer AV, Voorn P (1999) Convergence and segregation of ventral striatal inputs and outputs. *Ann N Y Acad Sci* 877:49–63
- Heck N, Betuing S, Vanhoutte P, Caboche J (2012) A deconvolution method to improve automated 3D-analysis of dendritic spines: application to a mouse model of Huntington’s disease. *Brain Struct Funct* 217(2):421–434
- Helmstaedter M, Briggman KL, Denk W (2008) 3D structural imaging of the brain with photons and electrons. *Curr Opin Neurobiol* 18(6):633–641
- Herzog E, Bellenchi GC, Gras C, Bernard V, Ravassard P, Bedet C, Gasnier B, Giros B, El Mestikawy S (2001) The existence of a second vesicular glutamate transporter specifies subpopulations of glutamatergic neurons. *J Neurosci* 21(22):RC181
- Herzog E, Nadrigny F, Silm K, Biesemann C, Helling I, Bersot T, Steffens H, Schwartzmann R, Nägerl UV, El Mestikawy S, Rhee J, Kirchhoff F, Brose N (2011) In vivo imaging of intersynaptic vesicle exchange using VGLUT1 Venus knock-in mice. *J Neurosci* 31(43):15544–15559

- Holtmaat A, Svoboda K (2009) Experience-dependent structural synaptic plasticity in the mammalian brain. *Nat Rev Neurosci* 10(9):647–658
- Huang YH, Lin Y, Mu P, Lee BR, Brown TE, Wayman G, Marie H, Liu W, Yan Z, Sorg BA, Schlüter OM, Zukin RS, Dong Y (2009) In vivo cocaine experience generates silent synapses. *Neuron* 63(1):40–47
- Hübener M, Bonhoeffer T (2010) Searching for engrams. *Neuron* 67(3):363–371
- Huerta-Ocampo I, Mena-Segovia J, Bolam JP (2013) Convergence of cortical and thalamic input to direct and indirect pathway medium spiny neurons in the striatum. *Brain Struct Funct*. doi:10.1007/s00429-013-0601-z
- Hyman SE, Malenka RC, Nestler EJ (2006) Neural mechanisms of addiction: the role of reward-related learning and memory. *Annu Rev Neurosci* 29:565–598
- Kalivas PW, Volkow ND (2011) New medications for drug addiction hiding in glutamatergic neuroplasticity. *Mol Psychiatry* 16(10):974–986
- Kim J, Zhao T, Petralia RS, Yu Y, Peng H, Myers E, Magee JC (2011) mGRASP enables mapping mammalian synaptic connectivity with light microscopy. *Nat Methods* 9(1):96–102
- Knott GW, Holtmaat A, Wilbrecht L, Welker E, Svoboda K (2006) Spine growth precedes synapse formation in the adult neocortex in vivo. *Nat Neurosci* 9(9):1117–1124
- Lee BR, Dong Y (2011) Cocaine-induced metaplasticity in the nucleus accumbens: silent synapse and beyond. *Neuropharmacology* 61(7):1060–1069
- Lüscher C, Malenka RC (2011) Drug-evoked synaptic plasticity in addiction: from molecular changes to circuit remodeling. *Neuron* 69(4):650–663
- MacAskill AF, Little JP, Cassel JM, Carter AG (2012) Subcellular connectivity underlies pathway-specific signaling in the nucleus accumbens. *Nat Neurosci* 15(12):1624–1626
- Mahon S, Deniau JM, Charpier S (2007) Corticostriatal plasticity: life after the depression. *Trends Neurosci* 27(8):460–467
- Meijering M (2012) Cell segmentation: 50 years down the road. *Signal Process Mag IEEE* 29(5):140–145
- Mishchenko Y, Hu T, Spacek J, Mendenhall J, Harris KM, Chklovskii DB (2010) Ultrastructural analysis of hippocampal neuropil from the connectomics perspective. *Neuron* 67(6):1009–1020
- Ollion J, Cochenne J, Loll F, Escudé C, Boudier T (2013) TANGO: a generic tool for high-throughput 3D image analysis for studying nuclear organization. *Bioinformatics* 29(14):1840–1841
- Osten P, Margrie TW (2013) Mapping brain circuitry with a light microscope. *Nat Methods* 10(6):515–523
- Pascoli V, Turiault M, Lüscher C (2011) Reversal of cocaine-evoked synaptic potentiation resets drug-induced adaptive behaviour. *Nature* 481(7379):71–75
- Pascoli V, Terrier J, Espallargues J, Valjent E, O'Connor EC, Lüscher C (2014) Contrasting forms of cocaine-evoked plasticity control components of relapse. *Nature* 509(7501):459–464
- Robinson TE, Kolb B (1999) Alterations in the morphology of dendrites and dendritic spines in the nucleus accumbens and prefrontal cortex following repeated treatment with amphetamine or cocaine. *Eur J Neurosci* 11(5):1598–1604
- Rodriguez A, Ehlenberger DB, Dickstein DL, Hof PR, Wearne SL (2008) Automated three-dimensional detection and shape classification of dendritic spines from fluorescence microscopy images. *PLoS One* 3(4):e1997
- Rotterman TM, Nardelli P, Cope TC, Alvarez FJ (2014) Normal distribution of VGLUT1 synapses on spinal motoneuron dendrites and their reorganization after nerve injury. *J Neurosci* 34(10):3475–3492
- Russo SJ, Dietz DM, Dumitriu D, Morrison JH, Malenka RC, Nestler EJ (2010) The addicted synapse: mechanisms of synaptic and structural plasticity in nucleus accumbens. *Trends Neurosci* 33(6):267–276
- Schneider CA, Rasband WS, Eliceiri KW (2012) NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat Methods* 9(7):671–675
- Schoonover CE, Tapia JC, Schilling VC, Wimmer V, Blazeski R, Zhang W, Mason CA, Bruno RM (2014) Comparative strength and dendritic organization of thalamocortical and corticocortical synapses onto excitatory layer 4 neurons. *J Neurosci* 34(20):6746–6758
- Sesack SR, Grace AA (2010) Cortico-Basal Ganglia reward network: microcircuitry. *Neuropsychopharmacology* 35(1):27–47
- Shaner NC, Steinbach PA, Tsien RY (2005) A guide to choosing fluorescent proteins. *Nat Methods* 12:905–909
- Shen HW, Toda S, Moussawi K, Bouknight A, Zahm DS, Kalivas PW (2009) Altered dendritic spine plasticity in cocaine-withdrawn rats. *J Neurosci* 29(9):2876–2884
- Spiga S, Acquas E, Puddu MC, Mulas G, Lintas A, Diana M (2011) Simultaneous golgi-cox and immunofluorescence using confocal microscopy. *Brain Struct Funct* 216(3):171–182
- Stepanyants A, Chklovskii DB (2005) Neurogeometry and potential synaptic connectivity. *Trends Neurosci* 28(7):387–394
- van Dongen YC, Mailly P, Thierry AM, Groenewegen HJ, Deniau JM (2008) Three-dimensional organization of dendrites and local axon collaterals of shell and core medium-sized spiny projection neurons of the rat nucleus accumbens. *Brain Struct Funct* 213(1–2):129–147
- Wickersham IR, Feinberg EH (2012) New technologies for imaging synaptic partners. *Curr Opin Neurobiol* 22(1):121–127
- Wickersham IR, Sullivan HA, Seung HS (2013) Axonal and subcellular labelling using modified rabies viral vectors. *Nat Commun* 4:2332
- Wilson CJ, Groves P-M, Kitai S-T, Linder J-C (1983) Three-dimensional structure of dendritic spines in the rat neostriatum. *J Neurosci* 3(2):383–388
- Wouterlood FG, Boekel AJ, Meijer GA, Beliën JA (2007) Computer-assisted estimation in the CNS of 3D multimarker ‘overlap’ or ‘touch’ at the level of individual nerve endings: a confocal laser scanning microscope application. *J Neurosci Res* 85(6):1215–1228